

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Biosíntesis de proteínas en bacterias : fijación de sustratos a
ribosomas en la formación de enlace peptídico : inhibición
específica por antibióticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ma. Luisa Celma Serrat

Madrid, 2015

B

BIBLIOTECA UCM



5305313780

T. 577.18

CEL

bio.

Donante: Sr. Dr.

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr.

Vocal: Sr. Dr.

Vocal: Sr. Dr.

Vocal: Sr. Dr.

Secretario: Sr. Dr.

BIOSINTESIS DE PROTEINAS EN BACTERIAS:

FIJACION DE SUSTRATOS A RIBOSOMAS EN LA FORMACION

DE ENLACE PEPTIDICO. INHIBICION ESPECIFICA POR ANTIBIOTICOS

TESIS presentada para optar al grado de
DOCTOR EN FARMACIA de la Universidad de
Madrid, Facultad de Farmacia, por

M^a Luisa Celma Serrat



R.- 19.264

Instituto de Biología Celular
Patronato Santiago Ramón y Cajal
C.S.I.C.
Madrid

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. D. Vázquez, director de esta Tesis, y al Dr. R.E. Monro, por su guía, apoyo y colaboración a lo largo del desarrollo de este trabajo. Así como a mis compañeros de laboratorio y al Dr. T. Staehelin por su amable acogida en su laboratorio durante la realización de las experiencias allí realizadas.

También mi agradecimiento a las Srtas. Rosario Gutiérrez y Pilar Ochoa por su inestimable asistencia técnica.

Este trabajo se ha llevado a cabo con ayuda del "Plan de Formación del Personal Investigador".

A mis padres

I N D I C E

=====

Pág.

INTRODUCCION	1
METODOS Y MATERIALES	
Ribosomas de E. Coli	52
Subunidades ribosomales de E. Coli	56
Núcleos ribosomales	61
Ribosomas de B. Subtilis	64
Ribosomas de A. montana	66
Preparación de Ac-Leu-tRNA	66
Preparación de FMet-tRNA	71
Preparación de fragmentos terminales de aminoacil-tRNA	72
Reacción de fragmentos	79
Fijación de sustratos:	
a) método de centrifugación	80
b) método de adsorción a filtros	82
c) método de filtración	83
Análisis de los productos de fijación de los sustratos a ribosomas	84
Análisis para la estimación de Leu-Leu	85
Materiales	87
Abreviaturas	89
RESULTADOS Y DISCUSION	
Capítulo I. Efecto de antibióticos en for- mación de enlace peptídico	90
Sistema de Ac-Leu-tRNA	90
Efecto comparativo de inhibidores utilizando como sustratos Ac-Leu-tRNA ó CACCA-Leu-Ac	95
Antagonismo eritromicina-lincomicina y eritromicina-cloranfenicol en la actividad peptidil-transferasa	97
Actividad peptidiltransferasa de ribo- somas de distintos organismos proca- rióticos. Su comportamiento frente a distintos antibióticos	101

Capítulo II. Sitios de fijación de sustratos en el centro peptidiltransferasa de ribosomas E. Coli	105
Fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas 70S y sus subunidades	105
a) Requerimiento iónico	109
b) Reversibilidad del complejo	114
c) Identificación del producto	116
Fijación de UACCA-Leu a ribosomas 70S y sus subunidades	118
a) Requerimiento iónico	123
b) Reversibilidad del complejo	126
c) Identificación del producto	130
Efecto de antibióticos sobre la fijación de CACCA-Leu y UACCA-Leu a subunidades 50S	131
Tipos de fijación de UACCA-Leu a ribosomas	137
Capítulo III. Mecanismo de acción de esparsomicina sobre el centro peptidiltransferasa del ribosoma	141
Formación del complejo CACCA-Leu-Ac-ribosomas inducido por esparsomicina ...	141
Estabilidad del complejo	146
Naturaleza del complejo	148
Incapacidad del complejo de reaccionar con puromicina	152
Efecto de antibióticos sobre la formación del complejo	157
Estequiometría de la fijación de CACCA-Leu-Ac en presencia de esparsomicina .	160
Aplicación del efecto de esparsomicina en los estudios de localización del centro peptidiltransferasa.....	163
CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFIA	176

I N T R O D U C C I O N

De los más importantes problemas que tiene hoy planteada la Biología es el del conocimiento detallado del - proceso de biosíntesis de proteínas. Aparte de la trascendencia que éste tiene para la comprensión de todo el metabolismo celular, es imprescindible para el entendimiento de los mecanismos de control que sobre él se ejercen, los cuales están en relación con procesos tales como diferenciación, regulación hormonal, infección vírica y efectos de interferon, producción de anticuerpos, etc.

Otra aplicación de este conocimiento es el aclarar el mecanismo de acción, resistencia-toxicidad, especificidad, etc. de antibióticos inhibidores de este proceso de síntesis de proteínas.

Uno de los objetos de este trabajo es el contribuir al esclarecimiento de la etapa concreta de formación de enlace peptídico de la biosíntesis general de proteínas - dentro del proceso global de traslación del mensaje genético. Para encuadrar esta etapa vamos a dar una visión del conocimiento actual del proceso de traslación.

Es sabido que la información genética contenida en el DNA como secuencia determinada de desoxinucleótidos ne-

cesita para su expresión de una molécula de ácido ribonucleico, RNA mensajero, de secuencia de nucleótidos complementaria a la de aquel. Los aminoácidos que formarán las proteínas, se alinearán en un orden determinado por el mRNA mediante la intervención de ácidos nucleicos específicos de transferencia, tRNA. Este proceso de polimerización ordenada se lleva a cabo en las partículas ribonucleo proteícas, que son los ribosomas, con la colaboración de una serie de factores proteícos y moléculas suministradoras de energía. La secuencia específica de aminoácidos de terminará básicamente la configuración de la proteína de la cual depende su función.

El proceso de traslación lo dividiremos para su estudio en cuatro fases principales: formación de aa-tRNA, iniciación, alargamiento y terminación de las cadenas peptídicas. (Revisiones de Lengyel y Söll, 1969; Lipmann, 1969; Spirin y Gavrilova, 1969; Chapeville y Haenni, 1969).

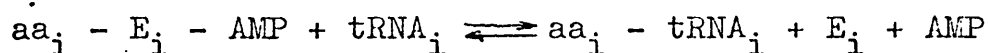
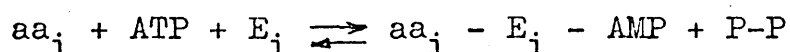
Los estudios realizados para intentar elucidar cada uno de estos pasos, se realizaron principalmente en extractos celulares, con lo cual fué posible un estudio más amplio a nivel molecular que el que se hubiera podido conseguir in vivo. En general en sistemas in vitro la cantidad

de proteína formada es medida por la incorporación de aminoácidos radioactivos en el material precipitable en medio ácido, siendo posible asignarles significado biológico a estos sistemas porque con ellos se han efectuado síntesis de proteínas de igual estructura a las sintetizadas en sistemas in vivo, como la hemoglobina y proteínas enzimáticas biológicamente activas como la lisozima (Salser, Gesteland y Bolle, 1967).

A continuación se describirá el estado actual del conocimiento de síntesis de proteínas en Escherichia Coli. Para que los aminoácidos puedan ser incorporados en una proteína, es necesario lo hagan formando parte de la molécula de aa-tRNA. El paso de aminoácidos libres a aa-tRNA tiene lugar mediante una reacción enzimática que transcurre en dos pasos: activación de los aminoácidos mediante formación de complejo rico en energía AMP-aminoácido-enzima y posterior reacción con el grupo 3'hidroxiterminal del tRNA específico para el aminoácido. La mayor parte de estos enzimas, aminoacil sintetisas, que se han purificado hasta el momento, tienen un peso molecular aproximado de 100.000, tratándose unos de una sola cadena peptídica (Hayashi y col., 1970), y otros de asociaciones de varias

cadenas u oligómeros aparentemente idénticas (Katze y Koenigsberg, 1970) o de pesos moleculares o secuencia diferente (Preddie, 1969; Ostrem y Berg, 1970). No es definitiva la existencia de una sóla sintetasa por cada aminoácido diferente, aunque por los datos actuales parece que éste es el caso.

En cuanto al mecanismo y requerimientos de estas reacciones enzimáticas no está totalmente esclarecido. El aislamiento del complejo aminoacil-AMP-sintetasa capaz de transferir el aminoácido a una molécula de tRNA (Lagerkrist y col., 1966; Norris y Berg, 1964), el requerimiento de ATP para el proceso de carga (Hoagland, 1955), así como el equilibrio isotópico entre dicho ATP y fosfato inorgánico (Demoss y Novelli, 1956), hacen que generalmente se admita el esquema:



Los requerimientos iónicos de estas reacciones enzimáticas varían según la sintetasa de que se trate. Se han aislado los complejos de sintetasa-ATP en ausencia de aminoácido y de tRNA (Rouget y Chapeville, 1968; Allende y col., 1970), lo que hace suponer que éste es el primer paso en la formación del complejo triple inicial. Por otro lado se han aislado complejos de sintetasas con tRNA usual

mente específicos de aquellas, que son reactivos o no según el proceso seguido para su aislamiento (Yarus y Berg 1967). Referente a la especificidad de estos sistemas enzimáticos hacia los distintos aminoácidos y tRNA, es de suma importancia para una traducción correcta del mensaje genético, de aquí el extensivo estudio dedicado a la misma. Hasta el momento se ha visto existe especificidad entre una sintetasa por un aminoácido y un tRNA determinado por ésta, aunque con baja frecuencia se dan casos en que un tRNA carga determinados aminoácidos no específicos, - produciendo el correspondiente error en la lectura del mRNA.

Durante el proceso de iniciación de la síntesis de proteínas, tiene lugar la asociación ordenada de las dos subunidades ribosómicas, FMet-tRNA, GTP y varios factores proteicos sobre la señal iniciadora del mensajero. Esta asociación procede a través de la formación de un complejo de iniciación (Nomura, Lowry y Guthrie, 1967; Guthrie, Nomura, 1968) 30S-mRNA-FMet-tRNA al que posteriormente se une la subunidad 50S.

El conocimiento de la existencia de metionina y alnina en el extremo NH_2 de gran parte de proteínas (Waller, 1963) y el descubrimiento de FMet-tRNA (Marcker, Sanger, 1964), hicieron pensar el posible papel iniciador de las

cadenas peptídicas de este Met-tRNA, que al tener bloqueado su NH_2 terminal a diferencia del resto de aminoacil-tRNA conocidos, no podría actuar durante la elongación de la cadena. Este hecho fué confirmado en sistemas in vitro, utilizando extractos de *E. Coli* y mensajeros endógenos (Capecchi, 1966), virales (Adams y Capecchi, 1966), y sintéticos (Clark y Marcker, 1966) al comprobar que la incorporación de formilmetionina tenía lugar en la posición - NH_2 terminal de las proteínas o péptidos sintetizados. El que muchas proteínas aisladas de *E. Coli* no posean en su extremo - NH_2 terminal el grupo formilo, la metionina y aún muchas veces otros aminoácidos finales, es debido a que una vez iniciada la cadena peptídica es desformilada (Adams, 1968) por una desformilasa específica de metionina y separados los aminoácidos por aminopeptidasas que todavía no han sido bien caracterizadas. Posiblemente la labilidad de estas enzimas durante la obtención de los extractos de *E. Coli* hace posible la síntesis in vitro de cadenas no desformiladas.

Por otra parte, los factores proteicos de iniciación que son al menos tres (F_1 , F_2 y F_3) se aíslan de las subunidades 30S nativas por tratamiento con soluciones salinas concentradas. El que no se encuentren en ribosomas 70S y en subunidades 50S, sugiere que se desprenden de la sub-

unidad 30S después de la formación del complejo de iniciación, habiendo ésto sido demostrado para el caso del factor F_1 (Hershey, Dewey y Thach, 1969). Aunque son necesarias estas proteínas para la traslación del mensajero natural (Revel, Brawerman, Lelong y Gros, 1968), así como para la formación del complejo de iniciación (Stanley, Salas, Wahba y Ochoa, 1966), sobre el papel de cada uno de estos factores en dichos procesos existen resultados contradictorios. Según unos autores, el factor F_2 tendría doble actividad, actuaría estimulando la fijación de mRNA a 30S y sería responsable de la fijación de estructuras tRNA iniciadoras como FMet-tRNA_F y Ac-Leu-tRNA , mientras que F_1 sería necesario para la formación del complejo de iniciación en presencia de ambas subunidades (Herzberg, Lelong, Revel, 1969; Revel y col., 1970). Para otros autores (Sabol, Sillero, Iwasaki y Ochoa, 1970) F_1 actuaría sobre la formación de complejo 30S-mRNA, actuando F_2 en la estimulación de la fijación de FMet-tRNA_F a este complejo. Con respecto al factor F_3 , ya que no es necesario para la traslación de mensajeros artificiales como ácido poliuridílico, así como para la formación del complejo de iniciación al utilizar como mensajero el triplete AUG, pero si para la lectura de mensajeros naturales, parece se precisa para la localización de la señal de iniciación

en estos mensajeros, teniendo además propiedades disociantes de ribosomas.

GTP, aunque igualmente necesario para la formación del complejo de iniciación (Hershey y Thach, 1967), no se sabe en la actualidad su exacta función. Estimula la fijación de FMet-tRNA a 30S (Hiller, Miller, Iwasaki y Wahba, 1967), de modo que por cada molécula fijada al complejo 30S-mRNA se fija una molécula de GTP (Thach y Thach, 1971), creyéndose se produce su hidrólisis durante (Sabol, Sillero, Iwasaki y Ochoa, 1970) o inmediatamente después de la asociación de la subunidad 50S al complejo de iniciación (Thach y Thach, 1971); la energía desprendida en esta hidrólisis se desconoce a qué proceso está ligada.

No se conoce el lugar de fijación de FMet-tRNA a 70S pero el hecho de que para su fijación GTP pueda ser sustituido por GMPPCP (Ohta, Sarkar y Thach, 1967), análogo de GTP no hidrolizable, y que una vez fijado en presencia de esta última molécula no sea reaccionable con puromicina, hace pensar que es necesaria la hidrólisis de GTP para que la fijación de FMet-tRNA al ribosoma tenga lugar en una posición que le permita la formación posterior de enlace peptídico.

En extractos de E. Coli existen dos especies de tRNA específico para metionina, tRNA_F y tRNA_M (Marcker,

1965); sobre ambos actúa la misma aminoacilsintetasa (Cassio y Waller, 1968), pero mientras Met-tRNA_F es formilable, Met-tRNA_M no lo es. Como anteriormente se ha indicado, FMet-tRNA_F sirve como fuente de metionina para la posición amino terminal, interviniendo Met-tRNA_M en la introducción de metionina en las posiciones internas de la cadena peptídica. Ya que los codones AUG y GUG codifican para FMet-tRNA iniciador y además para metionina y valina en lugares internos de la cadena peptídica, un problema que todavía está por resolver es como se verifica el reconocimiento de la señal de iniciación de lectura, es decir, por qué proceso es distinguido un AUG del principio de un cistron de una de las posiciones internas para que los ribosomas empiecen la traslación en el lugar adecuado. Parece ser que para el comienzo de la formación de una cadena peptídica no sólo es necesaria la presencia de un codón iniciador, sino que existe además una especificidad entre la estructura de la zona de mRNA en el que éste está incluido, la subunidad 30S y el factor de iniciación F₃ (Lodish, 1970; Szer y Brenowitz, 1970; Revel y col., 1970; Dube y Rudland, 1970; Klem, Hsu y Weiss, 1970).

Una vez unido FMet-tRNA_F al complejo ribosoma-mRNA tiene lugar la entrada de aa-tRNA codificada por el triple-

te adyacente al codón iniciador. A continuación se produce la formación de enlace peptídico catalizada por el enzima ribosómico peptidiltransferasa entre el NH_2 en α del nuevo aa-tRNA y el grupo carboxilo de metionina de FMet-tRNA_F , de modo que el dipéptido formado queda unido al ribosoma por el tRNA que entró en último lugar. Seguidamente en un proceso cuyo mecanismo todavía no es conocido el mRNA se desplaza con respecto al ribosoma en la dirección $5' - 3'$ se produce la salida de tRNA_F y mediante el sucesivo aporte de aminoacil tRNAs, de factores de elongación y GTP, por una serie periódica de etapas aún no esclarecidas. Se produce el crecimiento de la cadena peptídica con expulsión del ribosoma de los tRNA desacilados y desplazamiento de los ribosomas a lo largo del mRNA hasta encontrar un codón de terminación.

Existen diversos modelos que intentan dar cuenta de la organización del ribosoma en la sucesión de estos hechos. Según el modelo llamado de "traslocación", la formación de enlace peptídico implica la transferencia de péptido en crecimiento desde el tRNA unido a un sitio donador (sitio P del ribosoma) a un aa-tRNA, localizado en un sitio aceptor (A), siendo necesario para que se produzca un nuevo ciclo de formación de enlace peptídico que pepti-

dil-tRNA se "trasloque" desde el sitio aceptor al sitio donador. Este movimiento del peptidil-tRNA estaría acoplado con el del mensajero a través de la subunidad 30S, quedando libre de nuevo el sitio aceptor y dispuesto el códon en posición para la especificación del siguiente tRNA.

Dentro de este modelo general Bretscher (1968) y Spirin (1969), intentan explicar cómo tiene lugar el movimiento del ribosoma con respecto al mRNA. Según Bretscher, suponiendo la existencia de dos sitios asimétricos de fijación al ribosoma de aa-tRNA y de peptidil-tRNA tanto en la subunidad 50S como en la 30S, la traslocación sucedería en dos pasos. Antes de la traslocación coincidirían los sitios P y A de las subunidades y durante la misma habría desplazamiento relativo de una subunidad respecto a la otra, formándose una estructura intermedia híbrida en la que coincidiría sitio A de 50S con sitio P en 30S. Este modelo tendría la ventaja de que el desplazamiento de mRNA y peptidil-tRNA quedaría facilitado porque parte de esta última molécula al no desplazarse respecto de la subunidad 50S actuaría de anclaje en la misma en su movimiento sobre la subunidad 30S.

Para Spirin el desplazamiento del mensajero, ribosoma y tRNA tendría lugar por un mecanismo periódico de con-

tacto y separación parcial de las partículas del ribosoma dependiente de la energía prestada al sistema por el GTP. Supone que los sitios de fijación de aa-tRNA y peptidil-tRNA están localizados en la superficie de contacto de la subunidad 30S y 50S respectivamente, de modo que la afinidad del primer sustrato es mayor para 30S y la de peptidil-tRNA mayor para 50S, y que mRNA se sitúa en la superficie de contacto de la subunidad 30S. Una vez fijados los sustratos, las dos subunidades estarían en estrecho contacto con lo cual interaccionarían aquellos produciéndose la formación en 50S del enlace peptídico. Entonces el tRNA localizado en el sitio de peptidil-tRNA quedaría desacilado, pero con muy reducida afinidad por dicho sitio; por otra parte el tRNA fijado al sitio de aa-tRNA ocuparía su sitio en 30S, pero ahora al ser portador de una cadena peptídica habría adquirido mayor afinidad por el sitio de fijación de peptidil-tRNA a 50S. En estas condiciones por intervención de GTP se separarían las partículas con lo que el tRNA desacilado saldría del ribosoma y el residuo peptídico del nuevo peptidil-tRNA separaría del 30S el resto del tRNA, pasando a ocupar el sitio de peptidil-tRNA en 50S, arrastrando al triplete de mRNA, asociado con él, produciendo pues el desplazamiento de aquel con respecto a la subunidad 30S.

Como variantes del modelo general de traslocación mencionaremos los que postulan tres; (Noll, 1966; Culp, Keehan y Hardesty, 1969), o más sitios (Swan y col., 1969) de fijación de aminoacil-tRNA al ribosoma codificados por el mensajero. Por otra parte en un trabajo reciente Roufa, Skogerson y Leder (1970) muestran la existencia de la fijación codificada de sólo dos tRNA antes del proceso de traslocación, lo que está a favor del modelo de traslocación. El punto fundamental de éste, presupone que cada uno de los dos sitios, aceptor y donador, tienen una función única, haciendo al ribosoma asimétrico en su acción. En contraposición, se han formulado modelos que se basan en la simetría de los sitios de fijación de aa-tRNA al ribosoma. Así para Woese (1968), habrían dos sitios en el ribosoma funcionalmente equivalentes, es decir, podrían actuar como peptidil donadores o como aminoacil aceptores. La capacidad aceptora o donadora vendría condicionada por cambios configuracionales del asa de tRNA que porta el anticodón como consecuencia de la aceptación por aquel de la cadena peptídica. En este cambio no habría un movimiento del tRNA con respecto al ribosoma, traslocación, sino del codón y su anticodón, produciéndose en este movimiento la salida de tRNA deacilado, disponiendo al mRNA en posición de aceptar la configuración de un aminoacil-tRNA.

Aunque todavía está sin confirmar el modelo de traslocación, es el que mayor número de pruebas experimentales ha reunido a su favor, siendo el más comunmente aceptado; a él nos referimos en la descripción efectuada a continuación sobre el proceso de crecimiento de la cadena peptídica.

Acabada la fase de iniciación, en el complejo formado, FMet-tRNA queda unido al sitio P del ribosoma y a continuación como primer paso en el proceso de elongación tiene lugar la fijación en el sitio A del aminoacil-tRNA codificado por el triplete adyacente al iniciador. En dicha fijación intervienen GTP y una serie de factores proteicos aislados de la fracción no sedimentable de la obtención de ribosomas y a los que se denomina factores T_s y T_u . La fijación de aa-tRNA tiene lugar a través de la formación de un complejo T_u -GTP-aa-tRNA, complejo II (Lucas-Lenard, Haenni, (1968); Skoultchi y col. (1968); Shorey y col. (1969), que se une al ribosoma con desprendimiento del complejo T_u - GDP y de una molécula de fósforo inorgánico por cada aminoacil-tRNA unido al ribosoma (Ono y col., 1969). Los pasos intermedios para la formación del complejo II todavía no han sido esclarecidos, es posible tenga lugar a través de la formación de un com-

plejo intermedio $T_u - T_s$ formado por desplazamientos de GDP del complejo GDP- T_u por acción del factor T_s (Miller y Weissbach, 1970), ya que dichos complejos han podido ser aislados in vitro (Ertel, Redfield, Weissbach, 1968). T_s además parece actuar sobre el complejo T_u -GDP en presencia de GTP y aminoacil-tRNA, promoviendo la regeneración del complejo II.

Por otra parte se sabe que para la formación del complejo II es necesario que el grupo adenosina terminal 3' del tRNA esté íntegro y que se encuentre cargado con un aminoácido cuyo NH_2 en α esté libre, no siendo aceptado Met-tRNA formilable (Ono y col., 1968). Este último hecho hace pensar que sea el reconocimiento de Met tRNA_F por T_u el mecanismo por el cual no actúa dicha molécula como donadora de metionina en el interior de la cadena peptídica.

Previa formación de enlace peptídico y antes de producirse hidrólisis de GTP se postula la existencia del complejo peptidil-tRNA-ribosoma-aatRNA-mRNA al que está unido GTP y T_u (Skoultchi y col., 1970). Aunque tal complejo no ha podido ser aislado, sí lo ha sido el formado entre AcPhe-tRNA-ribosoma-Phe-tRNA en presencia de GMPPCP en lugar de GTP (Ono y col., 1969). El complejo así formado hace imposible la producción de enlace peptídico entre

AcPhetRNA y PhetRNA (Haenni y Lucas-Lenard, 1968), lo que parece indicar que la hidrólisis de GTP es necesaria para la fijación correcta de aminoacil-tRNA en el lugar aceptor del ribosoma.

Después de la unión de aa-tRNA el complejo FMet-tRNA ribosoma-mRNA en el primer ciclo de elongación o a peptidil-tRNA-ribosoma-mRNA en los ciclos posteriores, el siguiente proceso, es el de la formación de enlace peptídico cuyo estado actual de conocimiento será posteriormente descrito por ser su estudio objeto de nuestro trabajo.

A continuación de la formación de enlace peptídico el nuevo peptidil-tRNA ó el FMet-tRNA se localiza en el sitio aceptor del ribosoma y mediante la colaboración del GTP y un factor de la fracción soluble del extracto celular, factor G, se produce el paso del nuevo peptidil-tRNA al sitio donador del ribosoma y la salida del tRNA desacilado, quedando libre de nuevo el lugar aceptor, a la vez que el ribosoma se desplaza con respecto al mensajero. El requerimiento de G y GTP para estas reacciones se desprende de su necesidad para la formación de dos enlaces peptídicos para dar un tripéptido (Haenni y Lucas-Lenard, 1968), así como para situar en posición reaccionable con puromicina a FMet-Phe-tRNA formado sobre el ribosoma en su ausencia (Erbe y Leder, 1968). Del mismo modo el bloqueo de la

sección del factor G, bien por su antisuero (Leder, Skogerson y Rouja, 1969) o por el ácido fusídico (Tanaka, Kinoshita y Kuvano, 1968), impide la formación de cadena peptídica. Respecto al mecanismo por el cual se producen estos hechos, como ya se ha indicado, no está todavía elucidado. Se sabe que es necesaria la hidrólisis de GTP, ya que su análogo estructural no hidrolizable GMPPCP no puede sustituirle en esta función (Hershey y Monro, 1966). Por otra parte se conoce que G interacciona directamente con ribosomas ya que se aisló el complejo G-50S - GDP (Bodley y Lillian, 1970).

En cuanto a la salida del ribosoma del tRNA deacilado del sitio donador se sabe necesita del factor G y de la hidrólisis de GTP; ésto y el que no se produzca su expulsión en reacción del complejo Ac-Phe-tRNA-ribosoma con puromicina indica que esta salida tiene lugar durante el proceso de traslación (Lucas-Lenard, Haenni, 1969).

El crecimiento de la cadena peptídica prosigue por repetición de la secuencia de los fenómenos descritos hasta que el ribosoma alcanza una señal de terminación sobre el mRNA, en cuyo momento se produce la hidrólisis del éster que une a la cadena con el tRNA, con lo que queda aquella en libertad.

Los tripletes UAA, UAG y UGA se saben no codifican ningún aminoácido y pueden actuar como señales de terminación en E. Coli; sería necesario sin embargo la secuenciación de mensajeros naturales para poder establecer definitivamente la composición completa de estas señales (Nichols, 1970). En el proceso de terminación intervienen los factores proteicos de la fracción soluble de extractos celulares R_1 , R_2 y S. Que la hidrólisis de peptidil-tRNA dependía de los factores R_1 y R_2 fué primeramente demostrada por ensayos en los que utilizando un RNA de un mutante ambas del bacteriófago R17 con un codón de terminación en la séptima posición, en presencia de los correspondientes seis primeros aa-tRNA codificados por dicha RNA, la liberación del hexapéptido producido en condiciones de síntesis sólo tenía lugar si estaba presente una fracción proteica, a la que se llamó R (Cappechi, 1967).

Posteriormente, utilizando un sistema de ensayo más simplificado consistente en investigar la salida de formilmetionina del complejo FMet-tRNA-ribosoma-AUG, se pudieron confirmar los resultados anteriores y además fraccionar R en dos factores activos, de modo que la liberación de formilmetionina tenía lugar en presencia de cada uno de

los tres codones sin sentido y que en respuesta a UAA y UAG era el factor R_1 el que catalizaba dicha reacción, siéndolo R_2 en respuesta a UAA y UGA (Scolnick y col., 1968). Recientemente se ha ratificado la validez de estos hechos en condiciones de terminación normal, utilizando mRNA viral y suero anti R_1 y anti R_2 (Cappechi y Klein, 1970).

El factor S aunque por sí sólo no tiene acción terminadora, estimula la salida del péptido, tanto en presencia del factor R_1 como del R_2 , siendo posible que su manera de actuar sea la de facilitar la fijación del factor R al codón de terminación (Caskey y col., 1969).

El mecanismo de hidrólisis por el cual se libera la cadena peptídica es todavía desconocido. El hecho de que el peptidil-tRNA en el momento de terminación ocupe el lugar donador del ribosoma (Cappechi y Klein, 1970; Caskey y col., 1970), que la reacción sea inhibida por antibióticos que bloquean el enzima peptidiltransferasa y que la inactivación seguida de reactivación de dicho enzima sea paralela a la reacción de terminación (Vogel, Tamir y Elson, 1969), hace pensar en su intervención en este proceso de terminación. Por otra parte, los trabajos de Scolnick y col. (1970) y Falnestock y col. (1970), muestran que peptidiltransferasa cataliza no sólo formación

de enlace peptídico, sino de enlace éster. Según esto, si el enzima fuera necesario para catalizar el desprendimiento de la cadena peptídica, podría suponerse que el grupo aceptor de ésta sería el grupo hidróxido del agua.

Terminada la síntesis de la proteína, el tRNA fijado al ribosoma parece desprenderse por un factor distinto al que produce la salida de dichas moléculas durante la elongación (Kaji, Igarashi y Ishitsuka, 1969), abandonando el mensajero los ribosomas en forma de subunidades o como 70S. Cual de estas dos alternativas es la verdadera, está todavía en litigio; para unos autores (Kohler, Ron y Davis, 1968); Subramanian y Davis, 1970) lo harían en forma de 70S, que mediante un factor de disociación recientemente identificado como F_3 de iniciación, se disociarían en 50S y 30S, mientras que para otros (Margiarotti y Schlessinger, 1966; Nomura, 1970), se formarían las subunidades directamente del polisoma.

Como dijimos, nuestro trabajo está en relación con la etapa de formación de enlace peptídico y especialmente con la fijación de los sustratos entre los que tiene lugar. Para el estudio de transferencia de peptídicos desacoplada del resto de los procesos de la síntesis de proteínas, se necesitaba un sustrato que aceptara la cadena peptídica y

que fuera incapaz de proseguir la polimerización. El antibiótico inhibidor de síntesis de proteínas, puromicina, debe su acción a competir con el aminoacil-tRNA, según se deduce de los siguientes hechos: 1, la analogía estructural entre el mismo y el extremo aminoacil-adenocina de aa-tRNA (Yarmolinsky y de la Haba, 1959); 2, la liberación por puromicina de proteínas nacientes (Morris y Schwet, 1961), y de del tRNA (Gilbêrt, 1963 de los ribosomas); 3, la unión de puromicina a los péptidos liberados por ella (Allen y Zamecnik, 1962); 4, que in vivo la reacción de puromicina con las proteínas, en crecimiento se lleva a cabo por el extremo carboxílico terminal de éstos y el grupo NH_2 de puromicina, siendo este enlace sensible a enzimas proteolíticos (Nathans 1964). Así pues, debido a que puromicina es un análogo de la parte de la molécula de aminocil-tRNA que participa en la transferencia peptídica, careciendo de las zonas de esta molécula que interaccionan con el mensajero y el resto del ribosoma y que su producto de reacción se libera del ribosoma impidiendo posterior polimerización, hacen a este antibiótico adecuado para el propósito anterior.

Empleando la reacción con puromicina como un sistema modelo para el estudio de la formación de enlace peptídico y utilizando ribosomas 70S portadores de péptidos sintetizados por los mismos o bien sus subunidades 50S aisladas de éstos por centrifugación a baja concentración de Mg^{++}

(Trant y Monro, 1964) y Haden, Trant y Monro (1968) demuestran que la formación de peptidil-puromicina es independiente de GTP y factores de la fracción soluble de la célula, estando localizada en la subunidad 50S.

Esta reacción es de tipo enzimático como indica:

- a) la alta especificidad hacia el sustrato, así los análogos de puromicina con D-fenilalanina en vez de L-fenilalanina, como los que tienen el resto de aminoácido unido en 2' ó 5' en vez de 3' al aminonucleósido no son activos;
- b) la dependencia de esta reacción de ribosomas no desnaturizados; c) el comportamiento cinético de esta reacción que responde al postulado de Michaelis-Menten (Goldberg y Mitsugi, 1967b, Pestka, 1970; y Fernández-Muñoz, Tesis doctoral) y d) la alta especificidad hacia los iones y pH empleados (Maden, Monro, 1968).

Que el enzima responsable de esta reacción al que se denominó peptididiltransferasa, es parte constituyente de la subunidad 50S lo confirma el que sucesivos lavados de los ribosomas en condiciones iónicas de eliminación de proteínas de la fracción soluble no disminuya la actividad de aquellos, así como el que bloqueantes de grupos sulfhidrilo que inactivan los enzimas de dicha fracción

tampoco le afectan.

Estos hechos son corroborados por Rychlik (1966) en un sistema diferente. Este autor reune polilisil-tRNA a ribosomas lavados a alta concentración de sales en presencia de poli A y muestra que el complejo formado reacciona igualmente con puromicina en ausencia de factores solubles y GTP.

Sistema de reacción con puromicina análogo a los anteriores pero de más fácil caracterización es el que emplea como sustrato donador FMet-tRNA, iniciador natural de la cadena peptídica, unido a ribosomas en presencia de AUG (Bretscher y Marcker, 1966; Zamir, Leder y Elson, 1966). Otros aa-tRNA bloqueados en su NH₂ terminal se ha visto también actúan como iniciadores de proteínas (Lucas-Lenard y Lipman, 1967; y Igarashi, 1970), a concentraciones de Mg⁺⁺ fisiológicas, siendo a su vez sustratos reaccionables con puromicina. Así generalmente empleado es N-acetil-aminoacil tRNA introducido por la observación hecha por Haenni y Chapeville (1967) de que Acetil-fenilalanil-tRNA se incorporaba en el extremo NH₂ terminal de polifenilalamina sintetizada en presencia de poliU a alta concentración de Mg⁺⁺. Igualmente se comporta como el iniciador natural FMet-tRNA, en cuanto requiere factores de iniciación para

esta función en concentración de Mg^{++} fisiológicas (Lucas, Lenard y Lipmann, 1967). Su comportamiento es análogo al de peptidil-tRNA en su reactividad con puromicina como observaron Gottesman (1967) y Černá y col. (1969), entre otros autores, aunque su cinética de reacción es más lenta que la de peptidil-tRNA de tres o más aminoácidos, y más rápida que la de dipéptidos, mientras que aminoacil-tRNA no reacciona o lo hace muy lentamente (Pahet, Broot y Lapidot, 1970). Estos hechos sugieren que es necesario que no exista el grupo NH_2 libre y así protonable, en la proximidad del enlace éster del tRNA con el aminoácido unido a él para que la molécula se comporte como sustrato donador de peptidiltransferasa.

Que la reacción de puromicina tiene lugar por el mismo enzima que la formación de enlace peptídico en la síntesis de proteínas se forma por: 1, la misma especificidad de sus sustratos antes indicada; 2, la inhibición paralela de ambas por una serie de antibióticos; 3, los mismos requerimientos iónicos y no dependencia de GTP y factores de fracción soluble (Gottesman, 1970).

Aunque la reacción de puromicina requiere ribosomas 70S y mRNA (Hille y col., 1967; Bretscher y Marcker, 1966) y visto que el centro peptidiltransferasa está localizado en la subunidad 50S no había razón para que estas subunidades no fueran capaces de catalizarla. Así, Monro, Černá y Marcker (1968), utilizando 33 % (v/v) de metanol, obtuvie.

ron reacción de FMet-tRNA con puromicina en presencia únicamente de subunidades 50S. En estas condiciones, no sólo es catalizada la reacción de FMet-tRNA con puromicina sino con aa-tRNA para dar FMet-aa-tRNA (Monro, 1969). El metanol no es exclusivo en la producción de este efecto, otros compuestos orgánicos de cadena corta solubles en agua pueden hacerlo (Monro y col., 1969).

Por otra parte se ha difundido ampliamente el uso de etanol como activador de otras funciones ribosómicas. Así se está empleando en el estudio del proceso de terminación de biosíntesis de proteínas (Tompkins, Scolnik y Caskey, 1970), y en la promoción de la actividad GTPasa del factor G (Garcia-Ballesta, 1971).

No está esclarecido el efecto de los alcoholes sobre peptidiltransferasa; su acción no se debe a efectos de precipitación no específica de los ribosomas, ya que esta acción está en orden inversa a su capacidad precipitante; así, mientras metanol, etanol e isopropanol actúan en este orden como activadores, en ese mismo orden decrece su poder de precipitación. Tampoco se debe su efecto a una reducción de la constante dieléctrica del medio, ya que dioxano con una constante diez veces menor que etanol no tiene actividad (Silverstein, 1969). Es de destacar que

etanol no es requerido totalmente en este tipo de reacción, aunque en su ausencia ésta es muy lenta (Silverstein, 1969). También es de considerar el hecho de que variando la afinidad de algunos antibióticos inhibidores de formación de enlace peptídico por el ribosoma, no altera el número de sitios de fijación de los mismos (Fernandez-Muñoz, Tesis Doctoral 1971). Como veremos en este trabajo etanol produce un aumento en la fijación a ribosomas del sustrato donador de la reacción de puromicina, pudiendo ser ésta la explicación de su comportamiento como activador en esta reacción.

Es sabido tRNA interacciona con el ribosoma no sólo por el asa que contiene el anticodón (Petska y Nirenberg, 1966; Dube y col., 1969). Sino que además lo hace por otras regiones (Nobuyoshishimizu, Hayashi y Mirra, 1970), una de las cuales es el extremo 3' que se une al aminoácido (Cannon, Krug y Gibert, 1963; Takanami, 1962; Pestka, 1970). Con objeto de estudiar específicamente la reacción de peptidiltransferasa evitando la posible perturbación introducida por otras partes del tRNA distantes del centro enzimático, se ensayó la capacidad para actuar como sustratos donadores de esta reacción de distintos fragmentos terminales del extremo 3' de aa-tRNA con el NH_2 del aminoácido bloqueado. Se comprobó (Monro, Marcker, Černa, 1968) que era necesario que dichos sustratos tuvieran al menos el trinucleó-

tido CCA común a todos los tRNA conocidos, unido al aminoácido bloqueado, ya que si éste iba unido al dinucleótido CA no presentaba actividad.

Esta reacción de fragmentos activos con puromicina a la que se denomina "reacción de fragmento" es catalizada igualmente por la subunidad 50S que por ribosomas 70S y tiene los mismos requerimientos iónicos y de alcohol que la reacción de puromicina con subunidades 50S.

Como se aprecia, la reacción de fragmentos es pues, un sistema muy valioso para el estudio de la reacción de formación de enlace peptídico por la especificidad de los sustratos que circunscriben sus interacciones con el ribosoma al centro enzimático peptidiltransferasa.

Se admite que todo tRNA cargado con aminoácido, péptido o análogo capaz de transferir su carga a puromicina está situado en el sitio donador o sitio P del ribosoma, mientras que el sustrato capaz de recibir dicha carga se sitúa en el sitio aceptor (A). Así, con el fin de situar dicho sustrato durante cualquier fase del proceso de síntesis de proteínas o bien para determinar dónde se ha producido cualquier fijación de los mismos, se ha utilizado ampliamente la reacción de puromicina. Nosotros en este trabajo hemos utilizado la reacción de fragmentos como medio para situar la fijación de

fragmentos de aminoacil-tRNA y acetilaminoacil-tRNA, obtenidos por digestión por ribonucleasa T_1 . Ambas reacciones de puromicina y de fragmento se han usado (Černa, Rychlik y Pulkrabeck, 1969; Goldberg y Mitsugi, 1967b; Pestka, 1970, Monro y Vázquez, 1967) y nosotros lo hacemos en nuestro estudio para localizar el sitio de acción de inhibidores de síntesis de proteínas.

Así como fragmentos terminales de aa-tRNA con el grupo NH_2 de su aminoácido bloqueado funcionan como sustratos donadores de peptidiltransferasa, los que tienen este NH_2 libre pueden actuar como sustratos aceptores de peptidil-tRNA (Takanami, 1964). En este caso es necesario que el aminoácido esté unido al menos al dinucleótico CA terminal del aminoacil-tRNA, aunque en el caso de algunos aminoácidos sea suficiente con que éstos vayan unidos a adenosina (Rychlik, Chládek y Žemlička, 1967).

Fundamental para el conocimiento del mecanismo de polimerización de aminoácidos a partir de sus aa-tRNA es el esclarecimiento de las distintas interacciones de dichas moléculas con los ribosomas. Punto primordial de este trabajo es la fijación a ribosomas de E-Coli y sus subunidades de fragmentos de Ac-Leu-tRNA y Leu-tRNA, con el centro peptidiltransferasa del ribosoma. Dada la gran cantidad

de trabajos publicados sobre fijación de dichos tRNA, a pesar de lo cual son escasas las conclusiones obtenidas de éstos, vamos a dar una breve visión de los principales puntos conocidos en este campo.

A partir de la fijación de aa-tRNA llevada a cabo en presencia de factores de fijación al complejo ribosoma-mRNA, útil para el estudio global de fijación en las condiciones de síntesis de proteínas in vivo, pero con la dificultad de situar concretamente las interrelaciones del tRNA con el ribosoma, existen bajo la denominación de fijación no enzimática numerosos ensayos diferentes de fijación de tRNA en condiciones distintas. Todos ellos tienen de común el emplear más alta concentración de Mg^{++} (10 - 20 mM) que la enzimática (5 mM). Tanto para aa-tRNA como para peptidil-tRNA se han hecho ensayos de fijación a las subunidades 50S, 30S y a los ribosomas 70S; a éstas dos últimas tanto en presencia como en ausencia de RNA mensajero.

En cuanto a peptidil-tRNA hay acuerdo en que se fija más fuertemente a la subunidad 50S, a la cual permanece unida al disociar 70S en fase de polimerización a baja concentración de Mg^{++} (Gilbert, 1963). También se une como era de esperar, a la subunidad 30S en presencia de mensajero específico. De aquellas interacciones con subunidades 50S es probada la importancia de las que presenta por su extremo 3' termi

nal como se ha comentado anteriormente. Referente a las características de la fijación de peptidil-tRNA a la subunidad 30S, parecen ser análogas a las que presenta el aa-tRNA por la misma subunidad en cuanto a que ambas se estimulan por mRNA

(Niremborg, Pestka, 1966), tienen análogos requerimientos iónicos y las dos son inhibidas por tetraciclina (Jonák, Rychlik 1970). De todo ello parece desprenderse que la subunidad 30S no discrimina entre si tRNA está unido a aminoácido o a péptido.

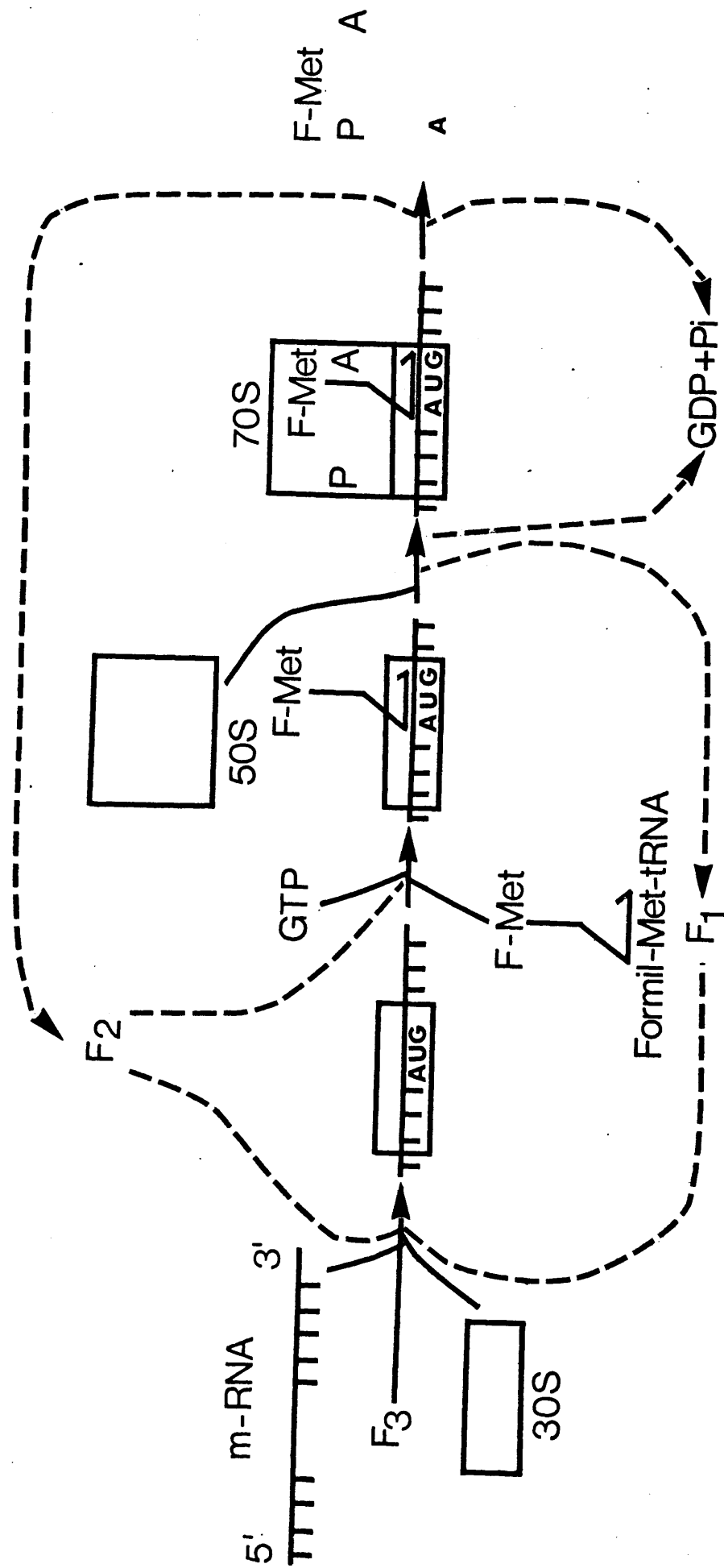
La fijación de peptidil-tRNA a 70S presenta ciertas diferencias con la de aa-tRNA; así, en su fijación es menos dependiente de mRNA (Rychlik, 1966; Pestka y Niremborg, 1966); en sus requerimientos iónicos ambos necesitan Mg^{++} para su fijación, mientras que parece ser que K^+ es requerido especialmente para la de aminoacil-tRNA (Rychlik, 1966); en su reactividad con puromicina, que siendo cuantitativa en el caso de peptidil-tRNA en distintas condiciones (Rychlik, 1966; Gottesman, 1967), para aminoacil-tRNA es parcialmente reactiva, dependiendo de las condiciones de fijación (Igarashi, Kaji, 1970).

Objetivo fundamental de la fijación no enzimática de tRNA a ribosomas es el conocimiento de la localización y caracterización de las interacciones de ambos. Con esta idea y para conocer las que tienen lugar en el centro peptidiltransferasa, hemos desarrollado en este trabajo, un sistema de fija-

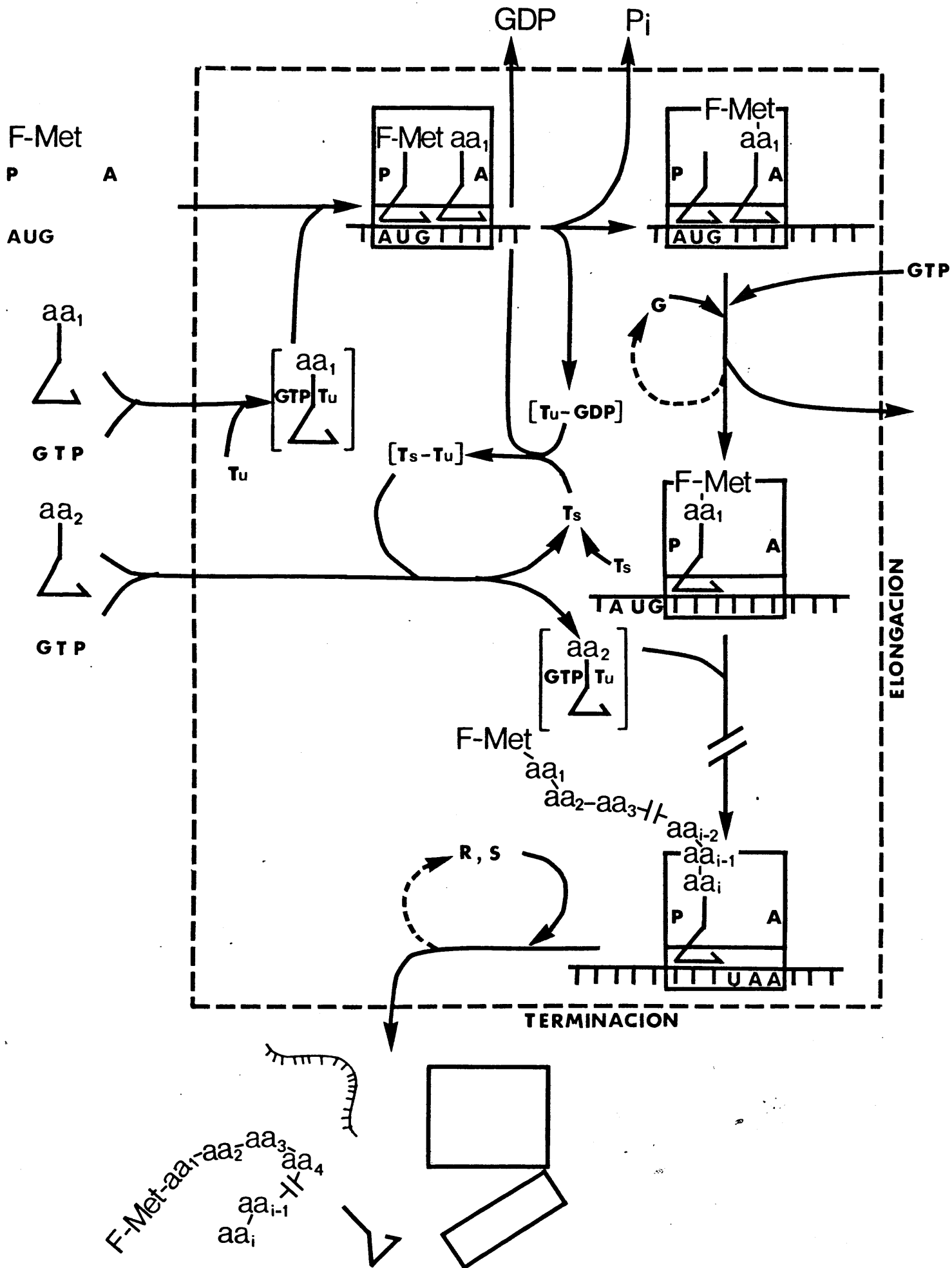
ción específica de fragmentos terminales 3' resultantes por digestión con ribonucleasa T_1 de Ac-Leu-tRNA y Leu-tRNA, que por las consideraciones hechas anteriormente respecto a la reacción con puromicina nos darán información sobre la especificidad y naturaleza de la fijación a los sitios P y A del ribosoma. Otro de los objetivos del desarrollo de este método es el conocimiento más concreto de la manera de actuar antibióticos inhibidores de sistemas de proteínas a nivel de ribosomas.

Un método importante para relacionar la estructura y funciones del ribosoma es el de separación secuencial específica de proteínas en condiciones iónicas determinadas. Con él se obtienen partículas ribonucleoproteicas deficitarias para aquellas, que retienen o pierden determinadas funciones según las proteínas eliminadas (Stachelin, Maglott y Monro, 1969). Con este sistema está establecido en qué etapa se pierde la función peptidiltransferasa, la cual puede recuperarse por la adición de las proteínas separadas. Esta técnica se ha aplicado en este trabajo para situar el área de fijación al ribosoma del antibiótico esparsomicina.

A continuación procederemos a exponer brevemente el estado actual del conocimiento del modo de acción de los antibióticos empleados en este estudio. Comenzaremos por describir esquemáticamente el mecanismo de acción del grupo de



INICIACION



las tetraciclinas.

Tetraciclinas, antibióticos producidos por distintas especies de streptomyces con estructura química muy semejante, presentan actividad en crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas, protozoos, rickettsias y algunos grandes virus (Laskin, 1967). También tiene acción en mitocondrias (Borst y Grivelh, 1971) y cloroplastos (Bonolto y col., 1969). Existe evidencia que interaccionan con varios procesos del metabolismo celular de los organismos sensibles a los mismos; aquí nos referiremos a los estudios llevados a cabo sobre sus efectos sobre síntesis de proteínas.

Tetraciclina inhibe síntesis de proteínas en bacterias intactas y en sistemas acelulares de bacterias y de reticulocitos, no inhibiendo formación de aa-tRNA, pero sí la incorporación de aminoácidos a polipéptidos (Franklin, 1963; Laskin y Chan, 1964; Clark y Chang, 1961; Day, 1966). Parece ser que la afinidad de tetraciclina para los ribosomas es mayor que para cualquier otra estructura celular, observándose se une a los ribosomas 70S y sus subunidades 30S en la proporción de una molécula por 30S (Connamacher y Mandel, 1968). Se ha encontrado que también hay fijación a la subunidad 50S pero que su afinidad es mucho menor (Day, 1966).

Se pensó que el paso específico de inhibición de síntesis de proteínas en bacterias era la inhibición de fijación de aa-tRNA al complejo mRNA-ribosoma (Hierowski, 1965; Suarez y Nathans, 1965). El que se correlacionen los efectos de una serie de derivados de tetraciclinas sobre crecimiento bacteriano in vitro, síntesis de péptidos en sistemas acelulares y fijación de aa-tRNA (Last, Izaki y Snell, 1969) parece confirmar esta suposición. En efecto se ha comprobado que tetraciclina inhibe fijación enzimática de aminoacil-tRNA (Lucas-Lenard y Haenni, 1968; Modolell y col., 1971), aunque parece también interaccionar con el sitio P del ribosoma, ya que inhibe fijación de peptidil-tRNA al ribosoma (Černá, Rychkik y Pulkrabeck, 1969). Otras reacciones que tienen lugar a nivel de ribosomas y que son bloqueadas por tetraciclina, son la formación de 70S, a partir de sus subunidades en extractos que contienen potasio (Phillips y col., 1969) y la inhibición del proceso de terminación (Scolnick y col., 1968); Vogel, Tamer y Elson, 1969).

El antibiótico edeina polipéptido básico aislado de cultivos de Bacillus brevis presenta actividad en bacterias Gram positivas y negativas, hongos, levaduras y células de organismos superiores (B.K. Bhuyan, 1967). En E. Coli produce bloqueo de su crecimiento, inhibiendo síntesis.

sis de DNA, estimulando síntesis de RNA y no teniendo efecto sobre síntesis de proteínas (Kurylo-Borowska, 1962). En sistemas acelulares de E. Coli (Hierowski y Kurylo-Borowska, 1965) edeina se fija a ribosomas 70S en proporción inversa a la concentración de magnesio, inhibiendo a concentraciones menores de las requeridas para su efecto in vivo incorporación de distintos aminoácidos. Su acción en síntesis de proteínas como indica su fijación, parece localizarse sobre los ribosomas, así no presenta efecto en formación de aa-tRNA. Concretamente su interacción parece localizarse con la fijación de aa-tRNA a la subunidad 30S (Vázquez, Monro, 1967), aunque parece tener también efecto sobre ribosomas 50S (Vázquez, 1967).

La inhibición de síntesis de polifenilalanina por edeina también ha sido observada en sistemas acelulares de levadura, bloqueando la fijación no enzimática de fenilalanil-tRNA a ribosomas 80S y a sus subunidades 40S (Battaner, Tesis doctoral, 1971). Se ha visto por otra parte que este antibiótico no inhibe formación de enlace peptídico al no inhibir reacción de fragmento (Monro y Vázquez, 1967). El que edeina inhiba síntesis de proteínas in vitro y no in vivo, no se conoce qué significado puede tener con respecto a su mecanismo de acción antibiótica.

También se ha empleado en nuestros estudios el polianión sulfato de polidextrano, el cual como otros polianiones (sulfato de polivinilo) parece comportarse como análogo de RNA; así, a bajas concentraciones inhibe ribonucleasas (Fellig, Wiley, 1959) por lo que se emplearon como protectores del mRNA en sistemas acelulares. A concentraciones algo mayores, es inhibidor de síntesis de proteínas en dichos sistemas, tanto en bacterias como en células de mamíferos (Munro, 1965, Shinozawa, Yahara y Imahori, 1968; Mathews y Korner, 1970). Se fija a bajas concentraciones a ribosomas 70S y a sus subunidades 30S produciendo agregados similares a polisomas, compitiendo con la fijación de poliU, lo que produce la inhibición de síntesis de polifenilalamina (Miyazawa y col., 1967; Shinozawa, Yahara y Imahori, 1968). Por este mismo efecto parece ser inhibe la fijación de aa-tRNA en presencia de mensajeros artificiales a ribosomas 70 y 80S y a sus subunidades 30 y 40S (Vázquez y Monro, 1967; Battaner, Tesis doctoral 1971). Por otro lado éstos no inhiben peptidiltransferasa en 70S, 80S, 60S o 50S (Monro y Vazquez, 1967; Battaner, Tesis doctoral 1971). Como polianiones que son estas moléculas actúan como detergentes a altas concentraciones, produciendo la separación de proteínas del ribosoma.

Pactamicina es un antibiótico de estructura desconocida producido por Streptomyces pactum que bloquea crecimiento

de células intactas y extractos de células procarióticas y eucarióticas, por lo que se ha ensayado como agente anti-tumoral. Su acción primaria parece ser la inhibición de síntesis de proteínas (Colombo, Felicetti y Baglioni, 1966; Bhuyan, 1967), habiendo sido detectada su fijación a sub-unidades 30S y 40S de ribosomas 70 y 80S respectivamente (Cohen, Goldberg y Herner, 1969). Inhibe incorporación de aminoácido en sistema acelular de E. Coli (Bhuyan, 1967) y de levaduras, donde también inhibe fijación de Acetil-fenilalalil-tRNA y fenilalanil-tRNA a 80S y 40S (Battaner Tesis doctoral 1971). Este antibiótico no afecta formación de enlace peptídico ya que no interfiere con la expulsión de péptidos unidos a polisomas (Felicetti, Colombo y Baglioni, 1966). Hay evidencia de que a bajas concentraciones afecta la correcta estructura del complejo de iniciación, actuando también aparentemente en el paso de crecimiento de la cadena peptídica a concentraciones más altas (Macdonald y Goldberg, 1970).

Se ha observado que ácido fusídico, antibiótico con núcleo esteroídico producido por varias especies de *Streptomyces* inhibe síntesis de proteínas tanto in vivo como in vitro en sistemas de bacterias. No afecta síntesis de aa-tRNA ni su unión al complejo ribosoma-mRNA, pero inhibe incorporación del mismo a proteínas (Yamaki, 1965, Harvey, Knight

y Shi, 1966; Tonaka, Yamaki, Lin y Umezawa, 1967). Este antibiótico se une al factor G de traslocación (Kinoshita, Kawano y Tonaka, 1968), siendo el grado de inhibición de esta reacción paralela al de síntesis de polipéptido. En efecto, ácido fusídico impide la reacción de peptidil-tRNA con puromicina dependiente de G y GTP (Tanaka, Kinoshita, Masukawa, 1969). Posiblemente este antibiótico también tiene efecto sobre el proceso de iniciación (Sala y Ciferri, 1970), aunque parece ser que para ésta no es necesario el factor G de traslocación.

Es cloranfenicol uno de los primeros antibióticos identificados como inhibidor de biosíntesis de proteínas. Es producido por *Streptomyces Venezuelae*, aunque en la actualidad se obtiene por síntesis química. Para su actividad biológica (Vázquez, 1966), se requiere la configuración D-treo, siendo los estereoisómeros D-eritro, L-treo y L-eritro inactivos. También es necesario tanto el anillo central como la cadena alifática, pero por el contrario el grupo NO_2 puede sustituirse por otros radicales y así se conocen una serie de derivados de actividad casi igual a cloranfenicol como son D-Win 5094, tiamicetina y D-AM P-3, los cuales veremos inhiben reacción de puromicina en un grado correlacionado con su actividad in vivo. Estudiando su posible

analogía con el aminoacil nucleósido terminal de tRNA se hidrolizó su grupo amida, siendo sustituido el resto dicloroacético por una serie de aminoácidos (Coutsgeorgopovbs, 1967), observándose que el cloranfenicol base es inactivo, mientras que los aminoácido-derivados presentan una actividad en síntesis de polipéptidos variables con el aminoácido, pero siempre menor que la del cloranfenicol.

Cloranfenicol es un antibiótico con amplio espectro de acción, así tiene análoga actividad sobre bacterias Gram positivas y negativas, inhibiendo crecimiento de algas azules (Rodríguez-López, Vázquez, 1968) y rikettsias. En organismos superiores produce ciertos efectos tóxicos, (Beard, Seven, Armentrout y Weissberger, 1969), por lo que su empleo queda limitado. La acción primaria del antibiótico es la de inhibir síntesis de proteínas, siendo otros procesos metabólicos afectados a través de esta inhibición (Wisselman y col. 1954; Gale y Folkes, 1953). Dentro del proceso de biosíntesis de proteínas cloranfenicol no afecta síntesis de aa-tRNA, localizándose su acción en la elongación de la cadena peptídica en sistemas acelulares (Nathans y Lipmann, 1961; Nirenberg y Mattaei, 1961). Se fija específicamente a ribosomas de organismos procarióticos, mientras no lo hace a ribosomas citoplasmáticos de eucarióti-

cos (Vázquez, 1964a), sin embargo inhibe biosíntesis de proteínas en mitocondrias, a lo cual posiblemente debe sus efectos tóxicos (Borst, Kroon y Ruttenberg, 1967). Se une a la subunidad 50S en la proporción de una molécula por ribosoma, siendo ésta fijación correlacionable con su efecto en síntesis de polipéptidos (Vázquez, 1963 y 1964). No está completamente esclarecido el paso en que actúa cloranfenicol durante el proceso de elongación. Existe fuerte evidencia de que inhibe formación de enlace peptídico en grado variable según la naturaleza de los sustratos empleados; así inhibe reacción de peptidil-tRNA unido a ribosomas con puromicina (Traut y Monro, 1964), reacción de Ac-fenilalanil-tRNA fijado a ribosoma con puromicina (Cerná, Rychlik, Pulkrabeck 1969; Gottesman, 1967) y a su vez es un buen inhibidor de reacción de fragmento (Monro y Marcker, 1967). Ya que cloranfenicol no interviene con la fijación de peptidil-tRNA al ribosoma (Cerná, Rychlik y Pulkrabek, 1969) ni con la fijación de aa-tRNA tanto no enzimática (Vázquez y Monro, 1967) como enzimática (Yukioka y Morisawa, 1969), no era posible conocer el mecanismo de su acción inhibidora sobre formación de enlace peptídico, aunque existía evidencia in directa de que cloranfenicol actuaba en el sitio A del ribosoma, al ser inhibidor competitivo mixto (Goldberg y

Mitsugi, 1967) o total (Pestka, 1970) de puromicina en su reacción con Peptidil-tRNA y Acetil-aminoacil-tRNA respectivamente unido a ribosoma. Nuestros resultados dan prueba directa de que este antibiótico inhibe fijación del extremo 3' terminal de aminoacil-tRNA. Este resultado no es contradictorio a los anteriores, ya que dada la existencia de múltiples interacciones entre tRNA y ribosomas, cloranfenicol inhibiría sólo aquellas necesarias para la formación de enlace peptídico.

Lincomicina es un antibiótico producido por *Streptomyces lincolensis* activo contra bacterias Gram positivas, algas azules, y en menor extensión bacterias Gram negativas (Chang y Weisblum, 1967; Rodríguez-López y Vázquez, 1968). No tiene actividad en citoplasma de células de organismos eucarióticos pero inhibe crecimiento de cloroplastos (Rodríguez-López y Vázquez, 1968) y mitocondrias de levaduras pero no de mamíferos (Firkin, Linane, 1969), por lo que debe tener este antibiótico menor toxicidad que cloranfenicol. Lincomicina inhibe en células intactas biosíntesis de proteínas, mientras síntesis de RNA y DNA continúa después de esta inhibición durante algún tiempo, lo que indica que su acción primaria es la inhibición de aquella (Josten, Allen, 1964). Estudios de síntesis de proteínas en extractos celulares de *E. Coli*, *B megaterium* y *Anacystis montana* corroboran

estos resultados, obteniéndose correlación entre la sensibilidad al antibiótico de los microorganismos empleados y la de los sistemas acelulares de los mismos (Vázquez, 1964a; Chang, Sih y Weissblum, 1966; Rodríguez-López y col., 1968). Se fija a ribosomas a la subunidad 50S (Vázquez, 1966; Chang Sih y Weissblum, 1966), en la proporción de una molécula por ribosoma (Chang y Weissblum, 1967; Fernández-Muñoz, Tesis doctoral, 1971). Se ha visto que este antibiótico inhibe formación de enlace peptídico por inhibir reacción de fragmento (Monro, Vázquez, 1967). En cuanto al sitio de actuación no existen pruebas concluyentes, ya que aunque se había observado inhibición en la fijación de aa-tRNA al ribosoma 70S en condiciones no enzimáticas, no se excluía la posibilidad de que en este tipo de ensayo se produjeron dipéptidos, y que fuera esta inhibición la detectada (Vázquez, Monro, 1967).

El análogo estructural de lincomicina, celesticetina es un antibiótico producido por *Streptomyces caelestis* que presenta in vivo mucha menor actividad que aquella. Respecto a su modo de acción se sabe (Monro, Vázquez, 1967), inhibe formación de enlace peptídico por bloquear reacción de fragmento, no conociéndose la naturaleza de esta inhibición.

Son los macrólidos un extenso grupo de antibióticos producidos por distintas especies de *Streptomyces* y que tienen de común en su estructura química el poseer un anillo lactónico de gran tamaño al que están unidos azúcares o aminoazúcares importantes para sus acciones inhibitoras. Todos ellos inhiben el crecimiento preferencialmente de bacterias Gram positivas, aunque su concentración inhibitora varía de unos a otros. Bloquean la biosíntesis de proteínas tanto en células intactas como en extractos de células (Brock y Brock, 1959; Vázquez, 1966; Mao y Wiegand, 1968), siendo dependiente esta inhibición de la composición del mRNA empleado. Su efecto en otros procesos metabólicos no es bien conocido. Se sabe no afectan la formación de aa-tRNA (Mao y Wiegand, 1968), luego su acción debe circunscribirse al proceso de elongación de la cadena peptídica. En efecto estos antibióticos se fijan a ribosomas de organismos procarióticos. Así, se ha detectado y medido fijación de eritromicina a subunidades 50S de varias bacterias (Oleinik y Corcoran, 1969; Mao y Putterman, 1969; Tanaka y Teraoka, 1966), en la proporción de una molécula por ribosoma y que ésta se correlaciona con la actividad de inhibición de síntesis de proteínas in vivo e in vitro (Wilhelm y Corcoran, 1967).

Espiramicina se fija a su vez a subunidades 50S (Vpazquez 1967a). Con respecto a la fijación de oleandomicina, carbomicina, neospiramicina III y forocidina III, se ha visto que interaccionan también directamente con esta subunidad al inhibir fijación de espiramicina o eritromicina (Vázquez, 1967b; Wilhelm, Oleinick y Corcoran, 1967).

No se conoce el paso de síntesis de proteínas sobre el ribosoma que afectan los macrólidos, así parece no inhiben fijación de mRNA a ribosomas (Mao y Wiegand, 1968), no inhiben fijación de aa-tRNA tanto enzimática como no enzimática (Mao y Robishaw, 1971; Tanaka, Teraoka, Nagira y Tamaki, 1966), ni fijación de peptidil-tRNA o análogos al ribosoma (Černá, Rychlik y Pulkřabek, 1969). Por otra parte tampoco inhiben hidrólisis de GTP dependiente del factor G ni del factor T, ni formación del complejo GTP-T-aa-tRNA (Mao y Robishaw, 1971). Con el sistema de reacción de fragmento se pueden distinguir una serie de macrólidos como espiramicina, carbomicina y angolamicina que inhiben formación de enlace peptídico, mientras que eritromicina, oleandomicina, neospiramicina y forocidina no actúan sobre esta reacción (Monro, Vázquez, 1967). Estos resultados han sido corroborados por su efecto en formación de dilisina en ausencia de traslocación y en reacción de FMet-tRNA con puromicina (Mao, Robishaw, 1971). Utilizando polilisil-tRNA

como sustrato donador en reacción con puromicina por el contrario eritromicina, oleandomicina y neospiramicina se muestran inhibidores de esta reacción aunque en menor grado que espiramicina (Černá, Rychlik y Pulkrabek, 1969), del mismo modo eritromicina inhibe la unión de una unidad de lisina a polilisil-tRNA fijado a ribosoma (Jayaraman y Goldberg 1968). Por otra parte se ha propuesto (Igarashi, Ishitsuka y Kaji, 1969; Oleinick y Corcoran, 1970) que algunos macrólidos como eritromicina inhiben el paso de traslocación en biosíntesis de proteínas. Los resultados en que se han basado han sido entre otros, que este antibiótico inhibe formación de acetil-trifenilalanina, mientras no afecta formación de acetil-difenilalanina en un sistema de enlace peptídico dirigido por poli U, suplementado o no con factores de traslocación y GTP (Corcoran y Oleinick, 1969).

Se ha indicado un posible mecanismo común para los macrólidos según el cual inhibirían con distinta intensidad formación de enlace peptídico, dependiendo ésta del sustrato empleado (Mao y Robishaw, 1971).

De importancia terapéutica es el conocido antagonismo observado in vivo entre eritromicina y lincomicina en bacterias resistentes a eritromicina y sensibles a lincomicina, de modo que en presencia de ambos antibióticos apenas

son afectadas por los mismos (Barber y Waterworth, 1964). En este trabajo se ha estudiado si este antagonismo responde a la anulación de la inhibición de la reacción del fragmento por lincomicina en presencia de eritromicina. Asimismo eritromicina es capaz de inhibir el efecto bloqueante de cloranfenicol sobre biosíntesis de proteínas. (Teraoka, Tonaka y Tamaki, 1969), por los resultados aquí expuestos mostramos el nivel al que se ejerce este efecto.

Las estreptograminas son antibióticos aislados de cultivos de distintas especies de Streptomyces, que se han agrupado según su estructura química global, en estreptograminas de tipo A y estreptograminas B. Las primeras poseen grandes anillos lactónicos que a diferencia de los macrólidos contienen átomos de nitrógeno, mientras las de tipo B forman anillos lactónicos con uniones peptídicas, cuyos aminoácidos son poco frecuentes, aunque no es conocido en su totalidad la estructura de algunos de estos antibióticos. Generalmente ambos grupos son producidos simultáneamente por la misma especie, presentando también su actividad caracteres sinérgicos in vivo (Vázquez, 1966a). Estos antibióticos son activos principalmente sobre bacterias Gram positivas.

En su modo de acción también existe diferencia entre ambos grupos, así las estreptograminas B son inhibidoras de biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y pared celular, siendo las estreptograminas A inhibidoras de biosíntesis de proteínas (Vázquez, 1966a). Inhiben incorporación de aminoácidos en sistemas acelulares no impidiendo la formación de aa-tRNA. Se fija estreptogramina A a la subunidad 50S del ribosoma, interaccionando estreptogramina B con ambas subunidades, (Vázquez, 1966b; Ennis, 1966 y 1971; Vázquez, 1967b, Chang, Siddhikal, Weissblum, 1969). Las estreptograminas del tipo B estimulan fijación de aminoacil-tRNA a la subunidad 30S, no teniendo las de tipo A ningún efecto o de ligera inhibición sobre esta fijación. Estreptogramina A inhibe formación de enlace peptídico (Monro y Vázquez, 1967), mientras estreptogramina B y su análogo muy activo Viridogriseina no ejercen ningún efecto. No se sabe todavía la reacción específica que bloquean estos últimos en la biosíntesis de proteínas.

Dentro de los antibióticos derivados de nucleósidos se han estudiado en este trabajo amicetina, gougerotina y esparsomicina. Amicetina es un producto del metabolismo de distintas especies de *Streptomyces*, que inhibe crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas y de células de mamífero (Revisión: Suhadolnick, 1970). Se sabe inhibe síntesis

sis de proteínas in vivo, inhibiendo a continuación síntesis de DNA y RNA probablemente como consecuencia de aquella inhibición (Brock, 1963; Block y Goutsogeorgopovlos, 1966), También inhibe síntesis de proteínas in vitro sin afectar la formación de aa-tRNA, no siendo capaz a pesar de su analogía con puromicina de producir la salida de cadenas peptídicas desde peptidil-tRNA fijado a ribosomas (Coutsogeorgopovlos, 1967). Se ha demostrado por experimentos de hibridización entre subunidades de ribosomas procedentes de organismos de distinta sensibilidad a este antibiótico y por experimentos de inhibición de fijación de cloranfenicol a ribosomas de B. estearoteimófilus (Chang, Siddikol, Weisblum, 1969), que amicetina interacciona con la subunidad 50S. Bloquea la formación de enlace peptídico, así impide la reacción de fragmento (Monro, Vázquez, 1967), y la reacción de puromicina con Acetil-fenilalanil-tRNA unido a ribosomas. Siendo en este caso inhibidor no competitivo para aquella (Pestka, 1970). Tiene a su vez efecto estimulante en la fijación de aa-tRNA a ribosomas (Vázquez, Monro, 1967), no conociéndose su interacción sobre la de peptil-tRNA.

Gougerotina es un antibiótico aislado de Streptomyces gougerotti de amplio espectro pero de poco valor terapéutico por su elevada toxicidad en mamíferos (Clark, 1967).

Es inhibidor de síntesis de proteínas en extractos celulares de *E. Coli* (Clark y Gunther, 1963), así como de hígado de rata (Sinohara y Sky-Peck, 1965) y de reticulocitos de conejo (Clark y Chang, 1965; Casjens y Morris, 1965). Su inhibición en la incorporación de aminoácidos en péptidos tiene lugar después de que éstos se han unido al correspondiente tRNA (Clark y Chang, 1965). Debido a su similitud estructural a puromicina se pensó que pudiera tener un mecanismo de acción análogo a ésta, pero los autores anteriores mostraron que no era éste el caso, ya que gougerotina no se unía a la cadena peptídica en formación. Se ha visto que inhibe formación de enlace peptídico bloqueando la reacción de fragmentos (Monro, Vázquez, 1967). En experimentos de formación de Ac-fenilalanil-puromicina (Pestka, 1970; polilisil-puromicina (Goldberg y Mitsugi, 1967), amicetina sería para Pestka inhibidor competitivo respecto a puromicina, mientras que para Goldberg sería de tipo competitivo mixto. Respecto a su efecto en fijación de aa-tRNA a ribosomas a alta concentración de magnesio, no es afectada ésta (Vázquez, Monro, 1967), siendo estimulada cuando se efectúa enzimáticamente (Yukioka y Morisawa, 1969). Con respecto a la fijación del análogo de peptidil-tRNA, gougerotina estimula la acción de Acetil-fenilalanil-tRNA al ribosoma (Herner, Goldberg y Cohen, 1969).

Espersomicina es uno de los antibióticos producidos por *Streptomyces spersógenes*, inhibe crecimiento de muchos organismos incluyendo bacterias Gram positivas y negativas, células de mamíferos, levaduras y mohos (Owen, Dietz y Camiener, 1962), habiéndose empleado como antitumoral con el inconveniente de presentar toxicidad. Aunque queda inhibida la síntesis de DNA y RNA en células de E. Coli con crecimiento parcialmente inhibido por espersomicina su sitio primario de acción es a nivel de la síntesis de proteínas, (Slecta, 1965). Es un inhibidor muy activo de síntesis de polipéptidos en extractos de E. Coli (Goldberg y Mitsugi, 1966), y de reticulocitos de conejo (Colombo, Felicetti y Baglioni, 1966). Corresponde el grado de inhibición de síntesis de proteínas in vitro al tipo de mRNA empleado, no produciendo errores de lectura de mensajero ni inhibiendo fijación de aminoacil-tRNA a ribosomas dirigida por mRNA (Vázquez y Monro, 1967; Goldberg y Mitsugi, 1967a). Bloquea formación de enlace peptídico al igual que lo hacen gougierotina y amicetina tanto en ribosomas 70S (Monro y Vázquez, 1967), como en ribosomas 80S (Battaner, Tesis doctoral, 1971); impidiendo la incorporación de una molécula de lisina a una cadena de polilisil-tRNA fijada previamente al ribosoma (Goldberg y Mitsugi, 1967), sin que esta ac-

ción inhibidora pueda ser revestida por concentraciones crecientes de $\text{Phe}^{\text{His}}\text{-tRNA}$. En experimentos análogos a los descritos para gougerotina, espersomicina, se muestra inhibidor competitivo con respecto a la puromicina en reacción de ésta con Acetil-fenilalanil-tRNA (Pestka, 1970) y con polilisil-tRNA (Godberg y Mitsugi, 1967). Asimismo Ravel y col. (1970) mostraron inhibe fijación enzimática de aminoacil-tRNA. De lo anterior podía concluirse que espersomicina interacciona con el centro peptidil-transferasa en el sitio aceptor, sin embargo no se conocía el mecanismo por el cual inhibe formación de enlace peptídico ni tampoco las interacciones que presenta con el sustrato donador; con nuestro trabajo se demuestra que este antibiótico produce un bloqueamiento del sustrato donador, no revestido por el sustrato aceptor. Trabajando con Ac-fenilalanil-tRNA (Herner y Goldberg, 1969; Jimenez, Monro, Vázquez, 1970), se ha corroborado el efecto estimulador de espersomicina sobre estos sustratos. A partir de los resultados aquí obtenidos se propone un mecanismo de su acción inhibidora sobre síntesis de proteínas.

Para esta serie de antibióticos, representantes de los principales grupos de inhibidores de biosíntesis de proteínas a nivel de crecimiento de la cadena peptídica, se han

estudiado las interacciones que presentan con peptidil-transferasa mediante las reacciones de puromicina, fragmento y nuestro método de fijación de sustratos simplificados. Este trabajo contribuye a localizar sus lugares de unión al ribosoma con respecto a los sitios aceptor y donador de péptido de este enzima ribosómico.

Métodos. y Materiales

Ribosomas 70S de E. Coli

Dada la naturaleza ribonucleoproteica de los ribosomas y debido a su fácil degradación por enzimas de actividad ribonucleásica, se partió de células de Escherichia Coli MRE 600 (Cammack y Wade, 1965) y D10 (Gesteland, 1966), cuyos ribosomas al carecer de Ribonucleasa I son más difícilmente degradables.

Las células E. Coli MRE 600 fueron crecidas por Microbiological Research Station, Porton, Gran Bretaña en cultivo continuo a 37°C en condiciones de carbono limitante.

El cultivo se enfrió a 4°C, las células se recogieron por centrifugación a 4°C; siendo a continuación lavados por resuspensión en solución tampón de Tris-ClH 10 mM, Mg (Ac)₂ 10 mM, pH final 7,4. Las células lavadas se volvieron a centrifugar, se congelaron rápidamente en porciones de 100 gr. conservándose a -20°C en bolsas de polietileno.

Las células de E. Coli D10 fueron crecidas por New England Enzyme Center, Tufts University, Boston, en medio de triptona a 37°C con aireación forzada hasta fase logarítmica tardía (alrededor de 10⁹ células por ml) en cuyo momento se paró la aireación, recogiendo las células por centrifugación continua a temperatura ambiente; la pasta celular recogida se dividió en porciones de 30 a 40 g. que se congelaron y guardaron a -20°C.

Se siguieron dos métodos de preparación de ribosomas: Método I, análogo al descrito por Nishizuka y Lipmann (1966) y Método II, descrito por Staehelin, Maglott y Monro (1969) basados ambos en la ruptura de las células por trituración con alúmina, separación de ribosomas de otras estructuras subcelulares y purificación por centrifugación en condiciones iónicas adecuadas.

Método I.- Durante todo el proceso se operó entre 0 y 4°C.

- a) Ruptura de células y aislamiento de ribosomas: Las células se trituraron en mortero en presencia de alúmina en proporción de dos gramos de alúmina por gramo de células, durante 5 minutos. Se añadió DNasa, purificada electroforéticamente, con objeto de disminuir la viscosidad del medio en proporción de 3 µg de DNasa por gramo de células congeladas. Se siguió triturando durante 20 minutos hasta obtener una consistencia pastosa. A continuación la pasta celular se extrajo con solución tampón A (Tris-ClH pH 7,5 10 mM, (Ac)2 Mg 10 mM, AcNH₄ 100 mM, βME 5 mM) en proporción de 3 ml por gramo de células. Se centrifugó a 5.000 g. durante 30 min. para eliminar alúmina, células enteras, separándose restos de paredes, membranas y otros orgánulos por centrifugación en Spinco a 30.000 g. durante 30 min., resultando el llamado extracto

crudo S_{30} . A continuación se sedimentaron los ribosomas por centrifugación a 150.000 g durante 120 min.

- b) Purificación: El lavado de ribosomas tiene por objeto eliminar la mayor parte de proteínas fijadas a los mismos ya sea por adherencia o por intermedio de tRNA al mismo tiempo que separar restos de tRNA y de mRNA. Para ello los ribosomas obtenidos en el paso anterior se resuspendieron en solución tampón de baja concentración de iones Mg^{++} y alta concentración de iones NH_4^+ (Tris-ClH pH 7,5 10 mM, $(Ac)_2Mg$ 1 mM, $AcNH_4$ 500 mM, β ME 5 mM) se centrifugaron a 30.000 g durante 30 min. para sedimentar agregados y de nuevo 120 min. a 150.000 g. Se eliminó la fracción no sedimentable y la capa proteica de tono pardo que quedaba sobre los ribosomas era eliminada por enérgica y rápida agitación con 1-2 ml de solución tampón. Los ribosomas se resuspendieron en el mínimo volumen manejable con solución tampón (A) y se clarificaron por ligera centrifugación a 2.000 g durante 10 min. para eliminar restos de material floculante.

Con objeto de eliminar las cadenas peptídicas fijas todavía a los ribosomas por el sitio donador o sitio P, los ribosomas excepto en el caso en que se indique fueron incubados a 37°C durante 30 min. con 0,1 mM Puromicina, siendo dializados 8 horas contra 200 veces su volumen

de solución tampón A a 0°C para eliminar restos de PM.

Método II.- En todo el proceso se operó, si no se indica lo contrario, entre 0 y 4°C. Por este método la ruptura y aislamiento de ribosomas es análoga a la efectuada en el Método I, pero el lavado de ribosomas se efectuó por centrifugación a través de una capa de sacarosa de alto contenido en iones NH_4 . Para ello el extracto crudo (S_{30}) se colocó en tubos de centrífuga sobre igual cantidad (6 ml) de Tris-ClH pH 7,5 20 mM, $(\text{Ac})_2\text{Mg}$ 20 mM, AcNH_4 500 mM, βME 5 mM, cuidando de no mezclar ambas capas. Se centrifugó a 145.000 g durante 7 horas 30 min., se eliminó el sobrenadante y la capa proteica adherida al sedimento se desprendió por agitación con solución tampón (A). Los ribosomas se re-suspendieron en el mínimo volumen del mismo tampón y clarificaron por centrifugación a 2000 g durante 20 min.

Excepto en el caso en que se indique se efectuó tratamiento de S_{30} con 0,1 mM de Puromicina por incubación a 37°C durante 30 min., posterior enfriamiento y centrifugación - sobre capa de sacarosa prosiguiéndose como se ha indicado anteriormente. El tratamiento con Puromicina en esta fase de obtención de ribosomas, tiene la ventaja de que al estar presente en la incubación enzimas del sobrenadante, la puromicina no sólo elimina las cadenas de peptidil-tRNA fijadas a sitio P sino que las fijadas a sitio A al producirse la

traslocación pasan a situarse al sitio reactivo con puromicina o sitio P, con lo que tiene lugar una mayor eliminación de cadenas peptídicas.

Los ribosomas obtenidos por ambos métodos eran repartidos en volúmenes de 0,2 ml para su conservación en N₂ líquido. En estas condiciones mantenían su actividad sin cambio apreciable varios meses y aún después de sufrir de dos a tres descongelaciones.

El rendimiento del método I osciló entre 0,8 y 1,2 % el del método II entre 1 y 1,5 % (p/p), expresado en peso seco de 70S calculado a partir de DO₂₆₀ a peso de pasta de células congeladas. Se asumió que 1mg/ml. de peso seco de ribosomas equivale a 17 unidades de densidad óptica a 260 mμ (Tissières y col., 1959; Hill, 1970). Las determinaciones de densidad óptica se efectuaron en un espectrofotómetro UNICAM.

Subunidades ribosomales de E. Coli.-

Se utilizó una modificación del método descrito por (Staehlin, Maglott y Monro, 1969) que consiste en la conversión de las partículas ribosómicas 70S en sus componentes de coeficiente de sedimentación 50S y 30S por exposición a concentraciones bajas de iones Mg⁺⁺ en presencia de altas concentraciones de iones amonio seguida de la separa-

ción de dichas subunidades por centrifugación a través de un gradiente lineal de sacarosa.

a) Disociación de partículas 70S.- El sedimento de ribosomas 70S obtenido como se indica en el apartado anterior por centrifugación a 150.000 g, se resuspendió en una pequeña cantidad de solución tampón AcNH_4 500 mM, $(\text{Ac})_2\text{Mg}$ 0,1 mM, Tris-ClH pH 7,5 20 mM. Esto disocia instantáneamente los ribosomas en 50S y 30S. A continuación se dializó durante 5 horas a 0°C contra 200 veces su volumen de $(\text{Ac})_2\text{Mg}$ 1 mM, AcNH_4 500 mM, Tris-ClH 20 mM, βME 5 mM, pH final 7,5. Es importante ajustar el pH a 7,5 ya que con valores más bajos no se produce completa disociación. Seguidamente se diluyeron ribosomas con la misma solución hasta 30 ml de modo que quedasen a una concentración final de 3 mg/ml. Operando con concentraciones mayores de ribosomas, los 50S obtenidos contenían cantidades significativas de subunidades 30S por lo que era necesario un nuevo proceso de purificación.

En los casos en que por conveniencia preparativa se partió de 70S en solución tampón standard, se diluyó dicha solución hasta 3 mg por ml para un volumen final de 30 ml con AcNH_4 500 mM $(\text{Ac})_2\text{Mg}$ 0,1 mM, Tris-ClH pH 7,5 20 mM, βME 5 mM, dializándose durante

5 horas a 0°C contra 2 litros de solución de las mismas condiciones iónicas que las empleadas en la diálisis indicadas anteriormente.

De esta manera, los ribosomas ya disociados quedaban preparados para el aislamiento de subunidades por centrifugación en gradiente.

- b) Preparación de gradientes.- Las condiciones iónicas de las soluciones de sacarosa empleadas fueron:
- $(\text{Ac})_2\text{Mg}$ 1 mM, NH_4Ac 100 mM, Tris-ClH 10 mM (βME $5 \times 10^{-3}\text{M}$, pH final 7,5. Los gradientes lineales utilizados se formaron en aparato especial para el efecto (Campbell y Sargent). En tubos de 58 ml del rotor SW 25-2 se formaron 34 ml de gradiente de sacarosa de 25 a 7 % (p/v). En el tercio superior del tubo se colocó otro gradiente lineal formado con 10 mM de solución de sacarosa al 4 % y 10 ml de los ribosomas procedentes de la diálisis. Se dejó reposar a 4°C durante una o dos horas y se centrifugó durante 16 horas a 2°C.

- c) c) Aislamiento de subunidades.- Efectuada la centrifugación en la parte media baja del tubo de centrífuga las partículas 30S forman una banda visible al ilu-

minar el tubo sobre un fondo oscuro. Se recogieron con la ayuda de una pipeta encorvada en su extremo en forma de U de modo que el orificio de la pipeta quedase siempre durante la aspiración en medio de la banda. La aspiración se hizo con la ayuda de una válvula de goma o propipeta. En los casos que se tuvo dificultad en ver la banda opalina de 30S y siempre habiendo utilizado las condiciones de centrifugación indicadas anteriormente, se recogió la mayor parte de 30S aspirando 10 ml de la solución de la zona media baja del tubo, teniendo la precaución que la curvatura de la pipeta estuviera de centímetro a centímetro y medio por encima del sedimento de 50S. La solución de 30S se ajustó a $(Ac)_2Mg$ 10 mM, debido a la inestabilidad de estas partículas en baja concentración de Mg. Se concentró por dilución al doble con solución tampón A y centrifugación durante 8 horas a 150.000 g. o por precipitación con 2,6 volúmenes de etanol a $-20^{\circ}C$ y centrifugación durante 15 min. a 2.000 g. En el último caso para eliminar restos de etanol, el sedimento se resuspendió en solución tampón A (unos 10 ml) y se centrifugó durante 8 horas a 150.000 g. Finalmente los ribosomas se resuspendieron en unos

0,5 ml de solución A y clarificaron por ligera centrifugación.

En el fondo del tubo de centrífuga aparece el sedimento de 50S que se lavó ligeramente para eliminar sacarosa, restos de material flocculante y 30S arrastrados, se resuspendió en el mínimo volumen de solución tampón A y clarificó por centrifugación durante 10 min. a 2.000 g.

Tanto las subunidades 50S como las 30S fueron distribuidas en pequeños volúmenes para su conservación en N_2 líquido, manteniendo su actividad en estas condiciones durante varios meses.

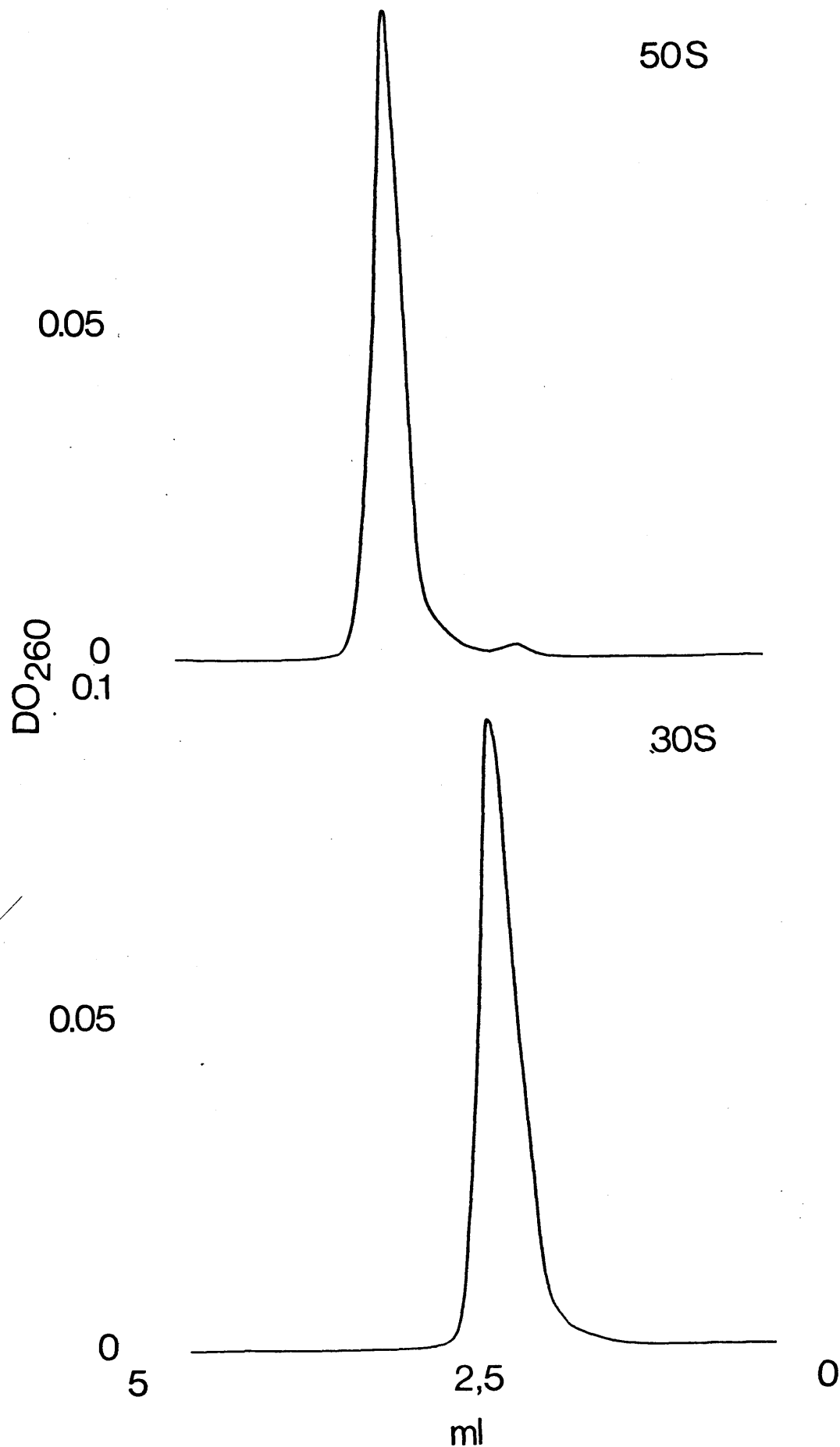
- d) Grado de pureza.- Se controló mediante la lectura del espectro ultravioleta a 260 m μ de un gradiente analítico de las subunidades a baja concentración de Mg^{++} . Las condiciones iónicas del gradiente fueron $(Ac)_2Mg$ 1 mM, $AcNH_4$ 100 mM y Tris-ClH pH 7,5 10 mM. En tubos de 7 ml de rotor SW 50 se formaron 5 ml de gradiente de sacarosa de 20 al 5 % (P/v). Sobre ellos se colocaron resbalando cuidadosamente sobre las paredes 0,05 mg/ml de subunidades 50S en 0,1 ml de $Mg(Ac)_2$ 0,1 mM, $AcNH_4$ 100mM y Tris-ClH pH 7,5 10 mM.

Se centrifugó durante 80 min. a 150.000 g y 2°C y leyó absorbancia a 260 mμ en un espectrofotómetro Isco con registro gráfico continuo. En estas condiciones iónicas no tiene lugar la formación de agregados ribosómicos quedando así resueltos los picos de 50S y 30S. En fig. 1 aparecen los espectros de absorción de las subunidades 50S y 30S de una de las preparaciones obtenidas.

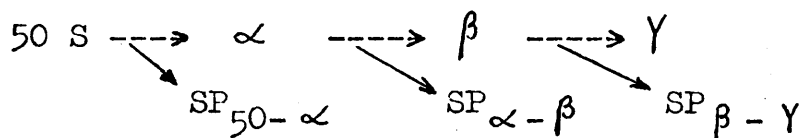
Núcleos ribosomales.

Se siguió el método descrito por Staehelin, Maglot, y Monro (1969), basado en la disociación escalonada de las partículas ribosomales en proteínas y subpartículas ribonucleoproteicas al ser sometidos a centrifugación en gradiente de ClCs.

Sometiendo las subunidades 50S a centrifugación en gradiente de ClCs hasta equilibrio de densidad, se forman tres bandas con una densidad aproximada de 1,62 g/cm³, 1,65 g/cm³ y 1,68 g/cm³. Las partículas recuperadas de dichas bandas son conocidas como α, β y γ respectivamente. Al mismo tiempo se separan un grupo específico de proteínas de dichas partículas según el esquema siguiente:



ig. 1 Perfil del gradiente de sacarosa para la estimación de pureza de Subuni-
ades 50S y 30S. La preparación y fraccionamiento de gradientes se efectuaron,
omo se indica en texto.



De modo que las partículas α resultan de la salida de un grupo específico de proteínas de la subunidad 50S, siendo las partículas β y γ consecuencia de la separación de proteínas $Sp_{\alpha-\beta}$ y $Sp_{\beta-\gamma}$ de las partículas α y β respectivamente.

a) Preparación de gradientes isopícnicos.- Para preparar la solución de ClCs de partida se disolvieron 65 g de ClCs en 33 ml de agua y se añadió 1,5 ml Tris pH 7,4 1 M. La solución así preparada se purificó por tratamiento con carbón vegetal que se eliminó por filtración en buchner. Se ajustó pH a 7,5 con ClH y el índice de refracción con ClCs sólido de manera que la solución final quedó con una densidad $\rho = 1,900$, índice de refracción $\eta = 1,4178 - 1,418$ y concentración del 65 % peso/peso.

En los gradientes la densidad final fué $\rho = 1,60 - 1,62$ y concentración aproximada del 41 % de ClCs (peso/peso). Para tres tubos de 5 ml se hizo una mezcla con un volumen final de 10 ml que contenía 6,8 ml de solución de ClCs $(Ac)_2Mg$ 10 mM, y subunidades 50S 10 mg/ml de E. Coli D-10. Se distribuyó exactamente entre los tres tubos

para evitar descompensaciones y se puso en la parte superior para evitar el gasto innecesario de ClCs, unos flotadores de consistencia especial para el efecto o en su ausencia 0,2 ml de agua destilada y 1,7 ml de parafina líquida. El agua evita la precipitación del ClCs en contacto con la parafina. Se centrifugó en un rotor SW-50 a 43500 rpm durante 20 horas a 3°C parándose la centrifugación en ausencia de freno para evitar la distorsión del gradiente.

Debido a que las partículas α son las más inestables aún a altas concentraciones de Mg por pasar a partículas β , a la concentración de Mg utilizado apareció en la superficie del gradiente la fracción proteica designada como SP₅₀- β y en la parte media del tubo dos bandas visibles sobre fondo oscuro; la superior es la de partículas β y la inferior la de partículas γ . Menos tiempo de centrifugación y menor concentración de Mg se requería para la obtención de partículas α .

- b) Recogida de núcleos ribosomales.- Se quitó cuidadosamente el flotador o la capa de parafina. En la parte superior del tubo aparecía la capa de proteína insolubilizada parcialmente en forma de película flotante y en la parte media aparecían las bandas de partículas. La pro-

teína se recogía solubilizándola con 0,4 ml de ClLi 500 mM, Tris 20 mM y Mg 40 mM, recogiendo a continuación las partículas con una jeringa provista de aguja larga de - diámetro bastante ancho y con extremo encorvado en forma de U. Mejores resultados se obtenían con una aguja cerrada en el extremo con un orificio lateral muy próximo a él. La aguja se introducía de modo que el orificio quedase en el medio de la banda a recoger y se subcionaba el líquido cuidando de mantener el orificio siempre a nivel de la banda. Para eliminar el ClCs se dializó la solución de partículas contra 200 volúmenes de $(\text{Ac})_2\text{Mg}$ 10 mM, EDTA 0,5 mM, ClNH_4 100 mM, Tris-ClH, pH 7,4 20 mM βME 3 mM, durante 2 horas a 0°C con agitación, guardándose para su conservación en alícuotas de 0,2 ml en N_2 líquido. La proteína se dializó igualmente pero con NH_4^+ 1 M y se guardó en hielo para evitar su desnaturalización.

Ribosomas de Bacillus subtilis.-

Las células de B. Subtilis W-23 fueron crecidas por la Microbiological Research Station, Porton, Gran Bretaña. Para la ruptura y extracción de ribosomas se siguió el método descrito por Takeda y Lipmann (1966). En proporción de 1 gr de células, 3 gr de polvo de vidrio Balotini y 2 gr

de solución tampón que contenía Tris-ClH pH 7,4 10 mM $(\text{Ac})_2\text{Mg}$ 10 mM, βME 5 mM, se rompieron las células en un homogenizador tipo Virtis, ajustado a 40.000 rpm aproximadamente. Para mantener la temperatura por debajo de 7°C el homogenizador se paraba después de un minuto de funcionamiento, durante unos minutos; repitiéndose la homogeneización nueve veces. La pasta obtenida se extrajo por dos veces con medio volumen de la solución tampón inicial centrifugándose 20 min. a 30.000 g. Las dos fracciones no sedimentables se combinaron y centrifugaron en las condiciones anteriores. A continuación se descartó el sedimento y se centrifugó 120 min. a 150.000 g, lavando el sedimento obtenido por resuspensión en solución tampón Tris-ClH pH 7,4 10 mM, $(\text{Ac})_4\text{Mg}$ 10 mM, AcNH_4 100 mM y βME 5 mM y centrifugaron 20 min. a 30.000 g. Se sedimentaron de nuevo los ribosomas durante 150 min. a 50.000 g. y se clarificaron por resuspensión posterior en la misma solución tampón, seguida de ligera centrifugación (20 min. a 30.000 g.).

El rendimiento del método, calculado como en el caso de ribosomas de E. Coli, oscilaba entre 2 y 3 % (p/p). Los ribosomas eran repartidos en volúmenes de 0,200 ml y conservados en nitrógeno líquido. Se observó que estos ribosomas son bastante inestables cuando se conservaban a 0°C, aumentando su inestabilidad con la presencia de iones monovalentes.

Ribosomas de *Anacystis montana*.

El alga azul *A. montana* crecida por el método descrito por M. Rodríguez-López y D. Vázquez (1968), nos fué donada por el Dr. Rodríguez López. Las células se rompieron en un fraccionador Ribi a 30.000 Psi; y los restos de paredes y membranas celulares se eliminaron por centrifugación 30 min. a 25.000 g. Los ribosomas fueron separados y lavados, como se ha descrito por Rodríguez-López y Vázquez (1968).

Preparación de Ac-(H³) Leu-tRNA.

El proceso consistió en la carga de tRNA con el aminoácido en presencia de moléculas suministradoras de energía y de sintetasas presentes en un extracto celular S₁₅₀. Aislado el aminoacil-tRNA se procedió a su acetilación con anhídrido acético. A continuación describiremos cada una de las fases del método, es decir obtención de extracto S₁₅₀, reacción de carga y de acetilación.

- a) Obtención del extracto celular S₁₅₀.- Se partió de 10 g de células de *E. Coli*, procediéndose a su ruptura por trituración a 0°C con alúmina como se indicó en la obtención de ribosomas de *E. Coli*. Una vez eliminados del lisado los restos de células y alúmina mediante centrifugación de 15 a 30 min. a 5.000 g. se separan los ribosomas por centrifugación a 150.000 g. durante 5 horas.

A la fracción no sedimentable se denomina extracto S_{150} que contiene junto con moléculas de bajo peso molecular, como son aminoácidos y nucleótidos, otras de peso molecular mayor como son ácidos nucleicos, proteínas de elongación y sintetetasas. Se recogieron los dos tercios superiores de esta fracción y se dializaron durante toda la noche contra 100 veces su volumen de la solución tampón que contenía Tris-ClH pH 7,5 20 mM, Cl_2Mg 10 mM y βME 10 mM, con objeto de eliminar los aminoácidos que alterarían la actividad específica en el proceso de carga. En algunos casos se eliminaron los ácidos nucleicos por el método de partición en fases descrito por Okazaki y Kornberg (1964). El extracto obtenido se dividió en fracciones, manteniéndose en nitrógeno líquido para su conservación. Debido a la labilidad de las sintetetasas, las fracciones sólo se descongelaban una vez antes de su uso. El extracto así obtenido era ensayado para ver su capacidad de carga de tRNA utilizando el mismo aminoácido marcado isotópicamente para el que se deseaba medir la actividad sintetasa. Se precipitaban los ácidos nucleicos añadiendo ácido tricloroacético frío al 5 % (P/v), se filtraban sobre filtros de vidrio Whatman GF/B o GF/C y se medía la radioactividad retenida que representa la cantidad de aminoácido unido a tRNA.

La mezcla de incubación contenía: $(\text{Ac})_2\text{Mg}$ 10 mM, ClK 100 mM, Tris-ClH pH 7,5 50 mM, fosfoenolpiruvato potásico 4 mM 60 $\mu\text{g/ml}$ de piruvato-cinasa, ATP 2 mM, CTP 0,2 mM, βME 6 mM, aminoácido marcado 6×10^{-5} M aproximadamente y tRNA 4×10^{-5} M. Se tomaban alícuotas de 0,050 ml, se añadía 10 %, 15 %, 20 % y 25 % en volumen del extracto S_{150} que se quería ensayar. Se incubó 15 min. a 37°C , parando la reacción al añadir 1 ml de ácido tricloroacético frío al 5 %, se agitó y filtró a través de filtros de vidrio Whatman GF/C o GF/B, lavando el filtro por tres veces con 1 ml de ácido tricloroacético frío. El filtro se secó y se midió radioactividad en contador de centelleo Packard, previa inmersión en líquido de centelleo (5 % de butil-PBD en tolueno).

La eficiencia de carga se calculó a partir de las dpm fijadas al filtro, y de la actividad específica del aminoácido ensayado. Según la preparación de extracto S_{150} , los moles de Leu marcada unidos por mol de tRNA oscilaba alrededor de 0,025.

- b) Reacción de carga de tRNA.- Transcurre en presencia del extracto S_{150} portador de las sintetasas, ATP necesario para activar el aminoácido a unir, Mg^{++} , tRNA deacilado y un sistema de regeneración de ATP como es fosfoenol-

piruvato potásico y piruvato-cinasa. En condiciones de exceso de ATP se puede prescindir del sistema regenerador. Se añadía también CTP con objeto de regenerar la porción terminal CCA intercambiable del tRNA, aunque en los casos en los que no se empleó la reacción de carga resultaba análoga. El resto del sistema empleado es para proporcionar el pH y las condiciones iónicas favorables para la reacción, así como β ME como protector de los grupos -SH de las sintetasas contra la oxidación.

La mezcla de incubación contenía: Tris-ClH pH 7,5 50 mM, $(\text{Ac})_2\text{Mg}$ 10 mM, ClK 100 mM, β ME 6 mM, ATP 1 mM, fosfoenolpiruvato potásico 5 mM piruvato-cinasa 60 $\mu\text{g/ml}$, CTP 0,2 mM, tRNA deacilado de 10 - 15 mg/ml Leu (H^3) de $2 - 5 \times 10^{-5}$ M y por último 10 % en volumen de S_{150} de E. Coli. La relación entre tRNA y Leu puesta en la mezcla se calculaba teniendo en cuenta, que del total del tRNA existente en E. Coli, sólo un 5 % es específico de Leu tomando como valor para el peso molecular de tRNA el de $2,5 \times 10^4$. En los casos en que no se empleó sistema regenerador de ATP, éste se añadió en una concentración de 3 mM.

Se incubaba la mezcla durante 15 min. a 37°C , tomándose alícuotas para estimación de DO_{260} y de radioactividad como valores totales para posterior cálculo del porcentaje de carga final. Acabada la incubación, se enfriaba a

0°C y se añadía un 10 % de su volumen de acetato sódico al 20 % (P/v) pH 5,4.

A continuación se procedía a la desproteínización y aislamiento de aa-tRNA. Para ello se añadía el mismo volumen de fenol saturado con agua, recientemente destilado. Se agitaba fuertemente durante 10 min. a 4°C y se centrifugaba la mezcla de 10 a 20 min. a 5.000 g. Una vez separadas las capas, se recoge la capa acuosa y se vuelve a extraer la capa fenólica con medio volumen de AcNa al 20% (p/v) pH 5,4. En la capa fenólica habrán quedado disueltas la mayor parte de proteínas de S_{150} y en la acuosa Leu-tRNA y moléculas de ATP, CTP, etc.

Seguidamente se precipitaban los ácidos nucleicos añadiendo al extracto dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C dejándolos precipitar de 1 a 2 horas a -20°C. Se centrifugaba a 500 g de 10 a 20 min., se decantaba el sobrenadante y el precipitado se lavaba por resuspensión en etanol y nueva centrifugación. El precipitado se secaba a vacío resuspendiéndolo en pequeño volumen de agua. En los casos en que se quiera separar restos de ATP, CTP y otras moléculas que pudieran permanecer en la preparación, se puede hacer pasando la preparación por una columna de Sephadex G-25, con lo que el aa-tRNA aparecerá en el volumen excluido.

Por lectura de DO_{260} y radioactividad de una alícuota se calculaba la eficiencia de extracción de tRNA que oscilaba entre el 50 y 100 % y la eficiencia de carga que teniendo en cuenta la actividad específica del aminoácido de partida y la eficiencia del contador era del orden de 0,02 moles de Leu por mol de tRNA. El Leu-tRNA obtenido se guardaba para su conservación en nitrógeno líquido.

- c) Acetilación de Leu-tRNA.- Se siguió básicamente el método descrito por Haenni y Chapeville (1966). A 15 mg de (H^3) Leu-tRNA contenido en un volumen de 1 ml se añadió 0,3 ml de AcNa 1 M pH 5, a continuación se añadieron a intervalos de 40 min. 0,030 ml de anhídrido acético hasta un total de 0,120 ml. Todo ello se efectuó a 0°C. Al final de la acetilación se añadieron 3 volúmenes de etanol a -20°C, se mantuvo a esa temperatura durante 2 horas. A continuación se recogió el precipitado por centrifugación a 5.000 g durante 10 - 20 min., se secó a vacío, se resuspendió en pequeño volumen de agua destilada y se guardó para su conservación en nitrógeno líquido.

Preparación de Formil- S^{35} Met-tRNA

Se efectuó en incubación análoga a la de obtención de aminoacil-tRNA, excepto que Leu fué sustituida por 5 %

de S^{35} Met de actividad específica aproximada de 500 mc/mmol, se añadió 2 mg/ml de tRNA deacilado y 0,6 mM de la sal cálcica del ácido folínico, procediéndose a continuación como se hizo para extraer Leu-tRNA, Conservándose igualmente en nitrógeno líquido.

Preparación de fragmentos terminales de aminoacil-tRNA.

a) CACCA-Leu y UACCA-Leu: Las secuencias terminales 3' de los tRNA específicos de Leu son GpCpApCpCpA-Leu y GpUpApCpCpA-Leu. Valiéndonos de la ribonucleasa T_1 , fofodiesterasa que rompe específicamente la unión 5' de guanin-nucleótidos, se pueden obtener los fragmentos anteriores por digestión controlada de Leu-tRNA con dicha RNasa y posterior aislamiento mediante electroforesis a alto voltaje.

La mezcla de incubación contenía unos 15 mg de H^3 Leu-tRNA en un volumen de 0,5 ml, EDTA 0,1 M 0,010 ml, AcNA al 20 % (p/v) pH 5,4 0,005 ml y RNAasa- T_1 en peso 200 veces menor que tRNA. Después de digestión durante 30 min. a 37°C la mezcla se fraccionó por electroforesis a pH 3,5 en papel Whatman 3 mm. aplicando una corriente de 50V/cm durante 210 min. La electroforesis se llevó a cabo en un aparato en el que el papel se introduce entre

dos planchetas metálicas refrigeradas basado en el descrito por Ingram y Stretton (1962) o en un tanque en el que el papel está inmerso en un líquido no polar, derivado de petróleo y que se refrigera mediante un serpentín de agua. La solución se dispuso cuidadosamente en el centro del papel a lo largo de unos 15 cm. Para localizar la posición de los fragmentos se cortó en el centro del papel una tira de 1 cm. de anchura, que se dividió a todo lo largo en fracciones de 1 cm. introduciéndose los trozos en líquido de centelleo (5 %o Butil-PBD en Tolueno) y contándose la radioactividad en contador de centelleo Packard.

En la figura 2A aparece el perfil de distribución de radioactividad. Los picos se identificaron por su carga característica a este pH (Smith, 1967; Cohn, Edsall, 1965); siendo el pico cargado más positivamente debido a leucina. La identidad de los picos se comprobó a pH 6,5, a cuyo pH los dos fragmentos como corresponde al pK de sus nucleótidos y del aminoácido, se desplazaban a igual distancia hacia el polo positivo, moviéndose el tercer pico como la H^3 Leu puesta de control.

Una vez efectuada la electroforesis preparativa a pH 3,5 antes indicada y localizada la posición de los fragmentos, se cortaron las zonas de papel adecuadas eluyéndose con agua a la temperatura de 4°C. Se liofilizaron las muestras, resuspendiéndose a continuación con agua destilada y conservándose en N₂ líquido.

En los casos en que se utilizó aminoácido marcado con C¹⁴ ó S³⁵ la localización de la radioactividad se efectuó mediante autorradiografía. En todas las preparaciones de fragmentos se tomó como actividad específica aproximada la correspondiente al aminoácido de partida.

- b) CACCA-Leu-Ac y UACCA-Leu-Ac.- Se obtuvieron por digestión de Ac-Leu-tRNA con RNAasa T₁, en las mismas condiciones utilizadas para la obtención de sus análogos no acetilados, seguida la separación por electroforesis en papel Whatman 3 mm a pH 3,5 durante 120 min. a 40 V/cm.

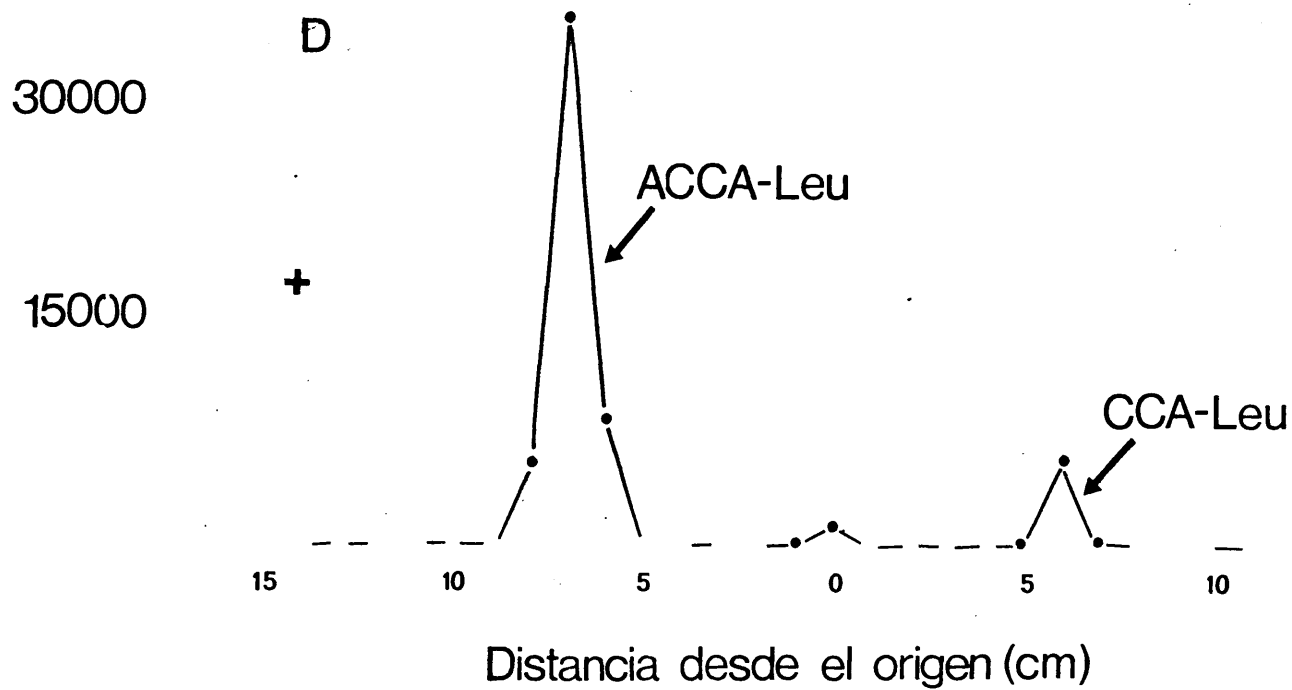
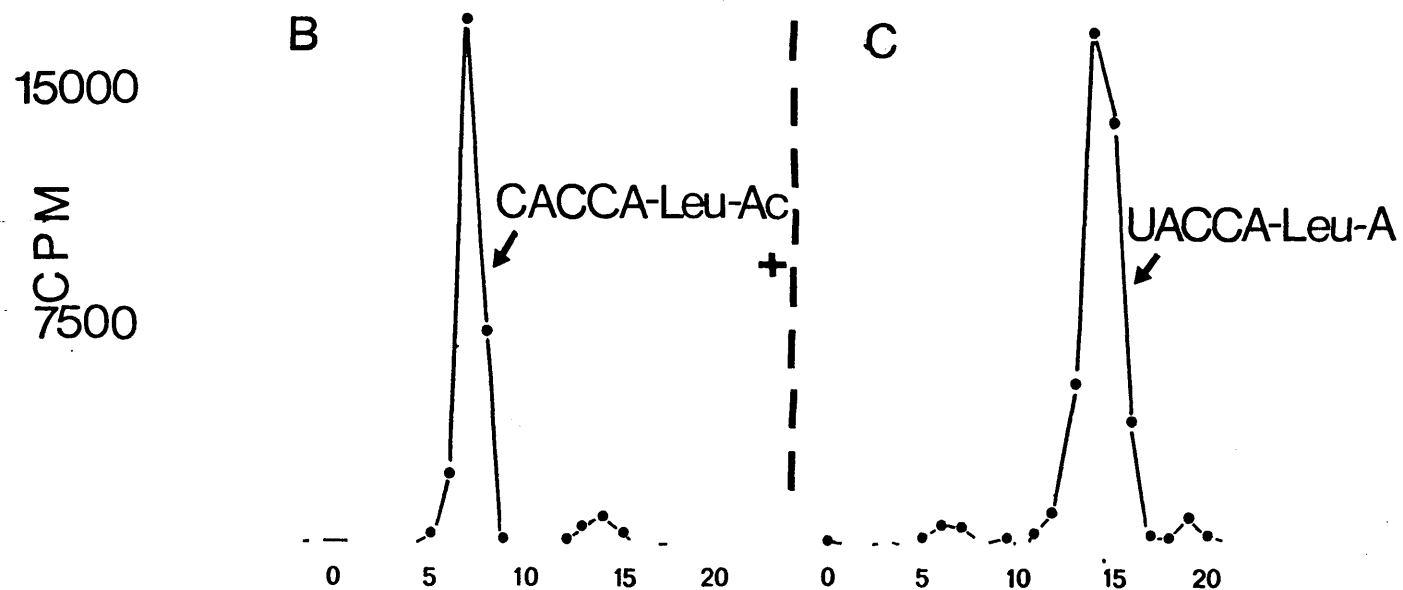
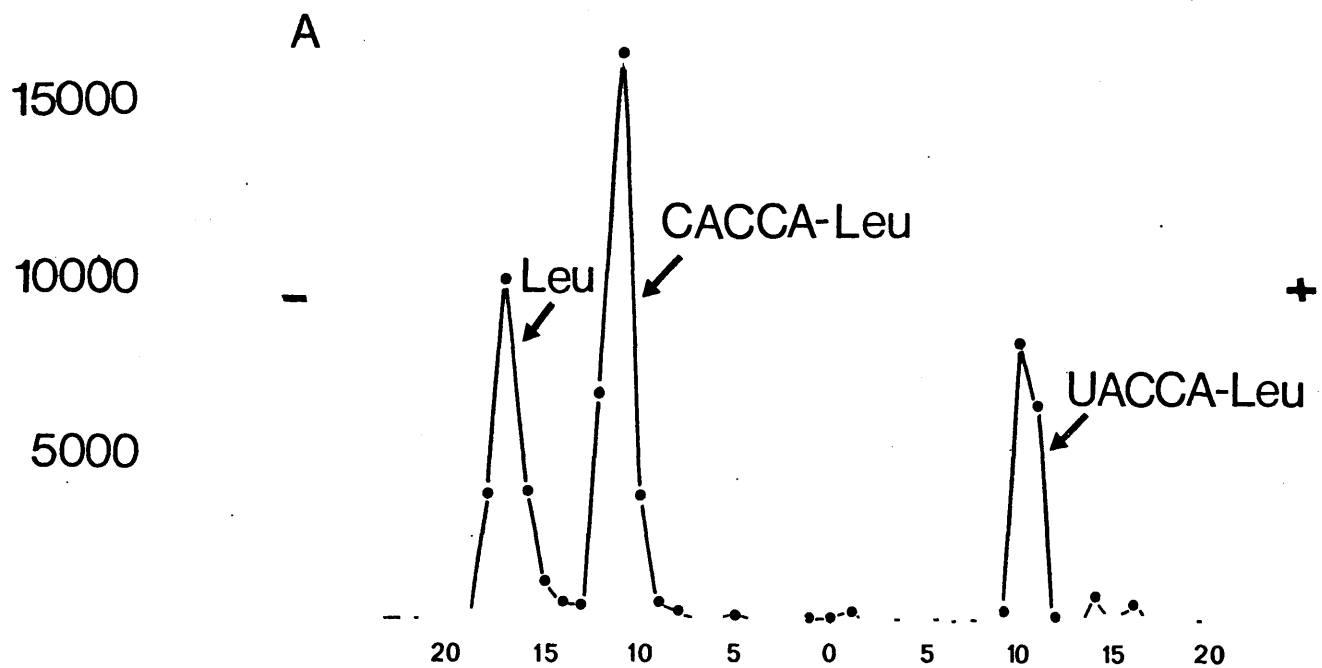
Con el objeto de tener preparaciones más puras, se obtuvieron también a partir de CACCA-Leu y UACCA-Leu sometiéndoles a acetilación con anhídrido acético y posterior repurificación por electroforesis en papel a pH 3,5. La acetilación se llevó a cabo a 0°C en las condiciones siguientes: 0,1 ml de CACCA-Leu ó UACCA-Leu, 0,030 ml. de AcNa 1 M pH 5 y 0,012 ml de anhídrido acético, añadi-

do en porciones de 0,003 ml a intervalos de 40 min. La electroforesis en papel se efectuó como se ha descrito anteriormente. En la fig. 2 aparecen los perfiles de radioactividad debida a los fragmentos CACCA-Leu-Ac y UACCA-Leu-Ac.

- c) ACCA-Leu-Ac y CCA-Leu-Ac.- Se prepararon a partir de UACCA-Leu-Ac por digestión controlada con fosfodiesterasa de bazo que rompe las uniones entre nucleótidos en 5', seguida por separación en electroforesis.

Se partió de una solución con 25 μ c de UACCA-Leu (H^3)-Ac, se liofilizó, resuspendió en 0,010 ml de AcNa 1 M pH 5,7 que contenía EDTA 0,02 M, y se añadió 0,04 ml de agua destilada. Para controlar la digestión con fosfodiesterasa se tomaron muestras de 0,005 ml que se mezclaron con 0,005 ml de enzima a 1 mg/ml y se incubaron a 37°C distintos tiempos. Las incubaciones se efectuaron en tubos capilares, haciéndose controles en ausencia de enzima. Una vez incubadas las muestras se sometieron a electroforesis en papel Whatman nº 52 a pH 3,5 y 76 V/cm durante 150 min. y se localizó la radioactividad a lo largo del papel por los métodos descritos anteriormente. La radioactividad correspondiente al producto original UACCA-Leu-Ac iba desapareciendo a lo largo

Fig. 2: Ionograma (pH 3,5) de: (A) producto de digestión de (H^3)Leu-tRNA con RNAasa- T_1 sometido como se indica en el texto a electroforesis en papel Whatman 3mm, 210 min a 43 v/cm. (B) y (C) CACCA(H^3)LeuAc y UACCA(H^3)LeuAc después de electroforesis en el mismo papel durante 120 min a 40 v/cm. (D) producto de digestión de UACCALeu(H^3)Ac por fosfodiesterasa de bazo sometido a electroforesis en papel Whatman nº 52 durante 150 min a 76 v/cm. Las restantes condiciones de ensayo se indican en el texto.



de la incubación apareciendo dos picos que se movían atendiendo a su carga como ACCA-Leu-Ac. Comprobado que a 90 min. en nuestras condiciones era completa la digestión, se efectuó la incubación preparativa con los 0,035 ml de solución de UACCA-Leu-Ac restantes, a los que se añadió 0,035 ml de enzima, incubándose el tiempo indicado. Se sometió la muestra a electroforesis, eluyéndose y guardándose los picos de radioactividad que aparecen en fig. 2 D que por su carga a ese pH corresponde a ACCA-Leu y CCA-Leu.

- d) P^{32} CCA.- Se preparó a partir de P^{32} tRNA por digestión con RNAasa T_1 en las condiciones especificadas en sección (a), seguido por electroforesis en papel Whatman 3 mm. a alto voltaje a pH 3,5 durante 160 min. a 60 V/cm. El fragmento terminal de todos los tRNA, CpCpA, a este pH está cargado positivamente, por lo que se mueve hacia el polo negativo. Mediante autorradiografía efectuada con película de Rayos X con un tiempo de exposición de 7 min., se apreciaban tres manchas de radioactividad desplazadas hacia el cátodo. Se cortaron las zonas de papel donde aparecían éstas, se eluyeron y se procedió a su identificación. Para ello sabido que la fosfodiesterasa de veneno de serpiente rompe los

polinucleóticos por sus uniones en 3' y la digestión con álcali lo hace en 5' el producto de degradación de CpCpA en el caso de digestión con fosfodiesterasa daría lugar a pC, pA y C y el procedente del tratamiento con alcalí daría Cp, Cp, A. Estos productos al ser sometidos a electroforesis a pH 3,5 y autorradiografía= dos debían dar en el caso de digestión con fosfodiestera= rasa dos manchas que se moverían hacia el polo positivo, mientras que por digestión con alcali darían una sólo mancha. Las tres manchas se sometieron por un lado a digestión durante 120 min., a 37° con fosfodiestera= rasa de modo que a 0,01 ml de preparación se añadió 0,001 ml de (Ac)₂Mg 0,1M Tris-ClH 0,1 M pH 8,5 0,0025 ml y fosfodiesterasa 0,0015 ml a 1 mg/ml. Mientras que otra porción de las mismas de 0,010 ml se incubó durante 19 horas a 37° C con 0,002 ml NaOH 1M. Se sometieron posteriormente a electroforesis a pH 3,5 en papel Whatman 52 durante 60 min. a 76 v/cm y se autorradiografiaron. Así se identificó una de las manchas como CCA, siendo repurificada posteriormente por electroforesis a pH 6,5 y pH 4.

- e) CAACAA-Met-Form.- Existen dos tRNA específicos de metionina uno formilable y otro no formilable en la propor=

ción de 60 y 40 respectivamente (Goldstein, Bennetty y Graig, 1964; Marcker, 1965). La secuencia terminal del tRNA formilable es CAACCA y la del no:formilable CCACCA (Dube y col., 1968; Cory y col., 1968). El producto resultante de carga de tRNA con S^{35} Met en presencia de la sal cálcica de ácido folínico se digirió con ribonucleasa T_1 de modo que 0,4 ml conteniendo aproximadamente 4 mg/ml de S^{35} F Met tRNA se incubaron 15 min. a 37°C en presencia de 0,004 ml de EDTA 0,2 M, AcNa al 20% (p/v) pH 5,5 0,040 ml y RNAasa T_1 en cantidad 100 veces menor a la de tRNA. Se sometió a electroforesis a pH 3,5 en papel Whatman 3 mm durante 120 min. a 100 v/cm, y se autorradiografió durante 6 horas. Aparecían cuatro impresiones en la película, dos de ellas desplazadas hacia el polo negativo y otras dos al positivo, las primeras correspondían por su movilidad a metionina y CCACCAMet, resultante esta última de digestión de Met-tRNA no formilable. Las manchas desplazadas hacia el polo positivo correspondían a CAACCA-Met y CAACCA-Met-Form (Marcker, 1965). Se eluyó con agua destilada la parte del papel que dió origen a esta última mancha y se guardó para su conservación en nitrógeno líquido.

Reacción de fragmento.

Consiste en la detección de la actividad peptidil-transferasa de ribosomas mediante la reacción de un fragmento 3' terminal de aminoacil-tRNA con puromicina en presencia de alcohol y en las condiciones iónicas y de pH adecuadas, siendo el producto de la reacción extraído con acetato de etilo (Maden, Monro, 1968).

La mezcla de incubación standard en un volumen de 0,100 ml contenía: 1 mg/ml de ribosomas 70S o de sus subunidades 50S, CACCA (H^3)Leu-Ac 2-3 mM (actividad específica aproximada 20 Ci/mmol, Tris-ClH pH 7,5 33 mM, $(Ac)_2Mg$ 13 mM, ClK 270 mM y puromicina 1 mM. La reacción que se efectuaba a 0°C se iniciaba por la adición de 0,050 ml de etanol frío. Transcurrido el tiempo de reacción ésta era parada por la adición de 0,100 ml de SO_4Be 0,1 M (neutralizado) y $AcNa$ 0,3 M (pH 5,5) saturado con SO_4Mg . Se añadía a continuación 1,5 ml de acetato de etilo, se agitaba la mezcla durante 30 segundos a temperatura ambiente y era centrifugada la mezcla a baja velocidad en centrífuga de mesa durante 1 o 2 min. Se tomaba 1 ml de la capa de acetato de etilo con cuidado de no tomar parte de la interfase y su radioactividad estimada era previa adición de 2 ml

de solución de líquido de centelleo (preparado por disolución de 20 g de BBOT ó de 5 g de butil-PBD en 1 litro de tolueno más 250 ml de 2-metoxietanol).

La extensión de la reacción se expresa en porcentaje de CACCA-Leu (H^3)Ac (insoluble en acetato de etilo) convertido en Ac-Leu(H^3) puromicina (soluble en acetato de etilo). La estimación de radioactividad total añadida por mezcla de incubación, se hizo mediante la lectura de 0,005 ml de solución de fragmento en mezcla con 1 ml de acetato de etilo y 2 ml del líquido de centelleo antes indicado. Por este método de ensayo era extraído más del 95% de los productos de la reacción derivados de puromicina (Monro, Cerná, Marcker, 1968) y los blancos en ausencia de puromicina eran menores del 4% de la radioactividad total. Los blancos a tiempo 0 min se efectuaron por adición a la mezcla de reacción de la solución de SO_4Be y posterior adición de etanol. Todas las experiencias se efectuaron por duplicado.

Fijación de sustratos.

- a) Método de centrifugación.- Consiste en la incubación de sustratos en presencia de ribosomas, en condiciones iónicas, de pH y etanol adecuados; separación de los ribosomas por centrifugación y estimación de la cantidad de sustrato unido a ellos por lectura de la radioactividad.

dad de una alícuota de la fracción no sedimentable, en la que se encuentra el sustrato no fijado.

La mezcla de incubación standard contenía (excepto cuando se indica lo contrario), en un volumen de 0,150 ml: UACCA- H^3)Leu 2 nM (actividad específica 20 Ci/mmol) ó 2 nM de CACCA- (H^3) Leu-Ac de la misma actividad específica, 3 - 5 mg/ml de ribosomas $(Ac)_2Mg$ 13 mM, ClK 270 mM, Tris-ClH pH 7,5 33 mM y 50% (v/v) de etanol. Se incubaba la mezcla a 0°C de 5 a 20 min. y se centrifugaba a 3000 g durante 20 min. a 4°C o 5 min. a 35000 g. Se tomaban 0,100 ml de la fracción no sedimentable, se añadían 3 ml de líquido de centelleo de Bray (1960) con 4% de CAB-O-SIL (preparado por disolución de 5 g de butil-PBD, 60 g de naftaleno en 100 ml de metanol absoluto, 20 ml de etilenglicol y p-dioxano hasta completar el volumen de 1 l. añadiéndose a continuación el gel CAB-O-SIL) y se estimaba su radioactividad por lectura en un contador de centelleo Packard. Se realizaron incubaciones semejantes sin ribosomas para apreciar la radioactividad total en condiciones de contaje análogas. Todas las experiencias se realizaron por duplicado. La cantidad de sustrato fijado se calculó por diferencia entre la radioactividad total y la no fijada.

En los ensayos de fijación en presencia de esparsomicina, la mezcla de incubación standard era semejante pero se empleó 1 mg/ml de ribosomas 70S, CACCA(H^3)Leu-Ac 7 nM (actividad específica aproximada 18 Ci/mmol), esparsomicina 0,1 mM (calculada en ausencia de etanol) y 33% (v/v) de etanol.

Este método es el seguido a lo largo de todos los experimentos de fijación de sustratos, excepto donde se indique lo contrario.

b) Método de adsorción a filtros de nitrato de celulosa.-

Con objeto de proceder a la saturación de ribosomas con sustrato y no efectuar un gasto excesivo de éste, era necesario emplear muy bajas concentraciones de ribosomas. Se procedió pues, al desarrollo de otro método de fijación que nos permitiera trabajar a menor concentración de ribosomas y con mezclas de incubación muy pequeñas. Consistía en la aplicación de la muestra de incubación (0,005 ml) una vez efectuada ésta, a filtros de nitrato de celulosa Millipore GSWP 04700. A ellos quedan adsorbidos los ribosomas y por tanto la radioactividad fijada a los mismos. A continuación el resto de la radioactividad no fijada a los ribosomas era eliminada por inmersión en vaso de precipitados conteniendo 100 ml de

una mezcla de alcohol-sales a la misma concentración - que la usada en la incubación, conteniendo esparsomicina 0,01 mM (cuando se efectuó la incubación en presencia de este antibiótico). Después de 10 min. a 0°C agitando - ocasionalmente, los filtros se transferían a otro recipiente que contenía los mismos componentes, siendo lavados otros 10 min. Se tomaban los filtros, se eliminaba el exceso de líquido mediante papel de filtro, se secaban a 70°C, se introducían en líquido de centelleo (Tolueno 5% butil-PBD) y la radioactividad estimada en un contador de centelleo.

A las diferentes mezclas de incubación en un volumen de 0,010 ml se les añadió partículas ribonucleoproteicas γ para evitar la adsorción de los ribosomas por el vidrio.

Se efectuaron ensayos previos para comprobar la retención del complejo ribosomas-sustrato por los filtros variando tiempo y número de lavados.

- c) Método de filtración.- Una vez efectuada la incubación con la mezcla que se indica en cada caso (0,150 ml), - ésta era diluída con 1 ml de una solución de sales-etanol igual a la empleada durante la incubación. A continuación la solución era filtrada a través de filtros de Whatman GF-C y la radioactividad no fijada a los ribo-

somas era eliminada por lavado de los filtros por dos veces con 2 ml de la solución anterior. Se secaban los filtros, se introducían en líquido de centelleo (Tolue no 5 %o butil-PBD) y la radioactividad medida en un - contador de centelleo Packard. Dicho método, por la di lución que supone de la mezcla sólo detecta fijaciones bastante estables.

Análisis de los productos de fijación de los sustratos a los ribosomas.

Efectuada la fijación en las condiciones indicadas en cada caso, el complejo ribosomas-sustrato era aislado por centrifugación, eliminada la porción no sedimentable y los ribosomas resuspendidos en 0,600 ml de $(Ac)_2Mg$ 0,1 mM. El complejo así disociado, era incubado la mezcla 5 min. durante 20 min. para asegurar la disociación; los ribosomas eran sedimentados por centrifugación unas 5 horas a 150.000 g y la fracción no sedimentable, liofilizada y resuspendida en 0,030 ml de agua destilada. En paralelo se trató una muestra control de sustrato en las mismas con diciones, omitiendo los ribosomas. Las muestras para su electroforesis se depositaron cuidadosamente con micropi-peta sobre el centro del papel a lo largo de 6 cm, de modo que la mancha fuera lo menos ancha posible. Se dejaba en-

tre las muestras una distancia de 3 cm. El papel era humedecido con la solución tampón deseada siendo sometido a electroforesis durante el tiempo y el voltaje indicado en cada caso. Para la localización de la radioactividad se cortaron tiras de 1 cm de anchura (todo a lo largo del papel) y de 7 cm de longitud, se sumergieron cada una de ellas en líquido de centelleo (Tolueno 5 % de butil-PBD) y se leyó su radioactividad en contador de centelleo Packard. Las identificaciones se efectuaron a pH 3,5 y pH 6,5. La composición de las soluciones tampón era de 40 ml de piridina, 400 ml de ácido acético y 7.600 ml de agua para pH 3,5 y de 800 ml de piridina, 24 ml de ácido acético y 7200 ml de agua para pH 6,5.

Análisis para la estimación de Leu-Leu.

La mezcla de incubación para este propósito contenía cinco veces el volumen de incubación standard (0,150 ml) empleado para la fijación de UACCA-(H³)Leu a subunidades 50S. Después de incubación durante 5 min a 0°C se centrifugó 5 min. a 35.000 g. La fracción no sedimentable, se liofilizó y se hidrolizó junto con el sedimento de ribosomas por incubación con NaOH 0,3 N a 37°C durante 30 min. La mezcla se neutralizó con ClH, el material insoluble en etanol se eliminó por adición de 50% (v/v) de etanol a 0°C

y centrifugación. Se añadió 50 μ g de Leu-Leu no radioactivos. Para separar Leu y Leu-Leu de la mezcla de sales, se liofilizaron las muestras y se extrajeron Leu y Leu-Leu tres veces con 0,8 ml de etanol que contenía ClH 0,1 N (Smith, 1960). El extracto se liofilizó, disolvió en agua, siendo analizado por cromatografía ascendente en papel Whatman nº 1, usando como solvente la mezcla butanol/acético/agua (90/10/29). Leu-Leu y Leu se localizaron por tinción con ninhidrina (ninhidrina al 0,2% en acetona) y Leu(H^3) y (H^3)Leu-(H^3)Leu fueron estimadas cortando tiras de 1 cm. de anchura, sumergiéndolas en líquido de centelleo y midiendo la radioactividad.

Materiales

Productos:

Tris (hidroximetil) aminometano, Sigma; sales inórganicas, ácidos, bases y otros productos no especificados, Merck; ATP, Sigma, CTP. Miles; fosfoenolpiruvato potásico y piruvato cinasa, Sigma; tRNA E. Coli B General Biochemical ó Schwarz; mercaptoetanol, Serva; ácido folínico, General Biochemicals; leucina, Calbiochem; leucil-leucina, Sigma; butil-PBD, Ciba; CAB-O-SIL, Packard; ribonucleasa T₁; Sankyo o Calbiochem; fosfodiesterasa de bazo, Worthington Biochem. Corpor; fosfodiesterasa de veneno de serpiente (Crotalus adamanteus), Sigma; DNA asa I, Sigma; tubo de diálisis. Visking (Serva); Sephadex G-25 y G-50, Pharmacia.

Productos radioactivos:

H³ leucina, C¹⁴ leucina, S³⁵ metionina, P³² tRNA, The Radiochemical Center, Amersham.

Antibióticos e inhibidores:

D-treo-cloranfenicol y L-treo cloranfenicol, Dr.J. Erlich (Parke Davis and Co., U.S.A.); D-treo-tiomocetina y D-treo Win 5094 Dr. R.A. Miley (Bayer products company. Gran Bretaña); D-treo-AMP-3, Dr. T.R. Wood (E.I. Du Pont de Nemours and Co., USA); estreptogramina A ó PA-114A-1 y estrepto-

gramina B ó PA-114 B-1, Dr. H.B. Woodruff (Merck Sharp and Dohme Research Laboratories, USA); Viridogriseina, Dr. H. Erlich (Parke Davis and Co., USA); espiamicina III, neospiamicina III, y forocidina III, Dr. A. Mc. Fadzean (May and Baker Ltd. Gran Bretaña); eritromicina (Abbot); oleanomicina y carbomicina, Dr. N. Belcher (Chas. Pfizer and Co., Inc. USA); angolamicina, Dr. W. Keller-Schierlein (Laboratorium für Organische Chemie, Zurich University, Switzerland); esparsomicina, amicetina y pactamicina Dr. Whitfield (Upjohn, Co., Kalamazoo, Michigan); gougerotina, Calbiochem; tetraciclina (Clorhidrato) Lederle; ácido fusídico, Dr. Godtfredson (Leo); sulfato de polidextrano (peso molecular 2×10^6), Pharmacia, Uppsala; lincomicina y celesticetina, Dr. G.M. Savage (Upjohn Co., USA) puromicina, Nutritional Biochem. Corporation.

Abreviaturas.

DNA ácido desoxirribonucleico; RNA ácido ribonucleico; tRNA y mRNA ácidos ribonucleicos de transferencia y mensajero; aa-tRNA aminoacil-tRNA; Ac-aa-tRNA N-acetil aminoacil-tRNA; Phe-tRNA, fenilalanil-tRNA; Leu-tRNA leucil-tRNA; ATP adenosina 5' trifosfato; CTP citidina 5' trifosfato; GTP guanosina 5' trifosfato; GMP-PCP análogo de GTP con grupo metilen entre los fosfatos β y γ ; CACCA, UACCA CCA, CA representan los polinucleóticos CpApCpCpA; UpApCpCpA; CpCpA y CpA respectivamente, siendo C, A, U, los nucleótidos citidina, adenosina y uridina y p los grupos fosfato que los unen de izquierda a derecha de 3' a 5'; EDTA sal sódica del ácido etilen-diamino-tetraacético; β ME β mercaptoetanol; AcNH₄ acetato amónico; (Ac)₂Mg acetato magnésico; Tris tris (hidroximetil) aminometano; cpm pulsos de radioactividad detectados por minuto; 70S, 50S y 30S partículas ribonucleoproteicas con este coeficiente de sedimentación en unidades Svedberg. PM puromicina; Ac-Leu-T₁ CACCALeuAc. CAP-cloranfenicol.

Resultados

CAPITULO I.

EFEECTO DE ANTIBIOTICOS EN FORMACION DE ENLACE PEPTIDICO

Sistema de Ac-Leu-tRNA

En los experimentos descritos a continuación, se ha investigado el efecto de antibióticos sobre la formación de enlace peptídico a nivel de ribosomas 70S. Para ello se ha utilizado el sistema simplificado de reacción de peptidil-tRNA con puromicina, empleando un N α -acetil-aminoacil-tRNA como análogo de peptidil-tRNA sobre la base de su función equivalente en la reacción de transferencia peptídica (Gottesman 1967).

Ac-Leu-tRNA en una reacción análoga a la de formación de enlace peptídico, es capaz de reaccionar con puromicina en presencia de subunidades 50S y de metanol para formar Ac-Leu-PM (Monro, Cerná y Marcker, 1968). En la figura 3, se representa la cinética de esta reacción, mostrando que ésta en las condiciones empleadas ya se ha completado a los 40 min de incubación, habiendo reaccionado un 86% de la radioactividad inicial añadida. El material extraíble en ausencia de puromicina aunque en pequeña cantidad, aumentaba con el tiempo, posiblemente es debido a la formación de éster entre el grupo carboxi de acetil-leucina y el metanol (Silversstein, 1969). Se comenzó ensayando el efecto de una serie de

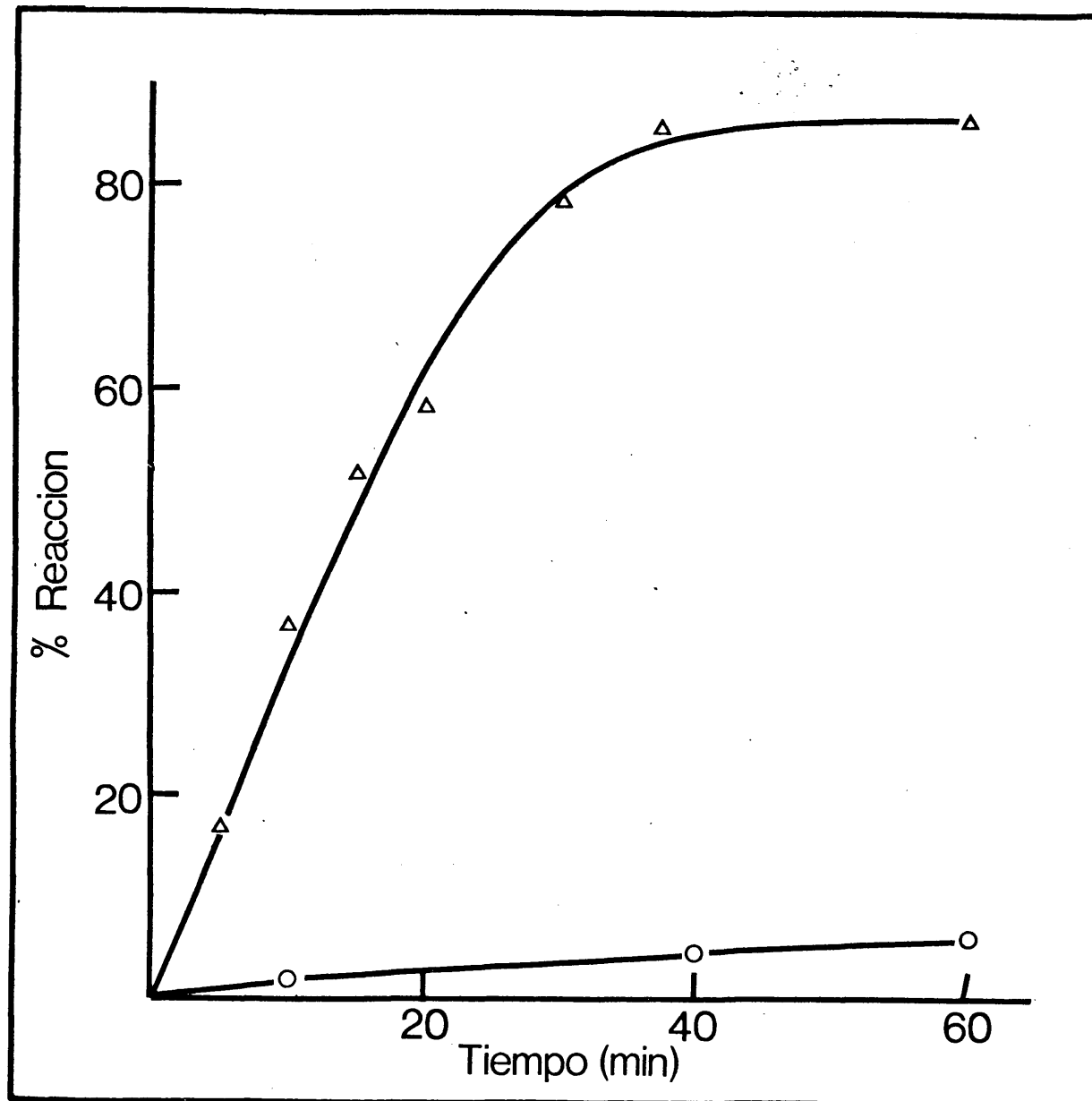


FIG. 3.- Cinética de reacción de Ac-Leu-tRNA con puromicina. La mezcla de incubación en un volumen de 0,100 ml contenía: Tris-ClH pH 7,5, 50 mM, $(Ac)_2Mg$ 20 mM, ClK 400 mM, puromicina 1 mM y 0,25 mg/ml de subunidades 50S de E. Coli D-10 (no tratadas con puromicina y 7 nM de Ac-Leu- H^3) tRNA (actividad específica aproximada de 29 C/mmol). Las muestras se enfriaron a 0°C y la reacción se inició por adición de 0,050 ml de metanol. Después de los tiempos indicados, la reacción se paró por adición de 0,025 ml de SO_4Be 0,1 M y acetato sódico pH 5,5, saturado con SO_4Mg . El producto Ac-Leu-puromicina formado fué extraído y la radioactividad estimada como se indica en métodos para la reacción del fragmento.

Incubación efectuada en presencia (Δ-Δ) ó en ausencia (o-o) de puromicina.

antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas a dos tiempos de dicha reacción; el primero en la fase lineal y el segundo en la fase de equilibrio con el fin de poder discernir su acción en la velocidad y en la extensión de la reacción. Los resultados obtenidos, expuestos en Tabla I, muestran que el antibiótico natural cloranfenicol, D-treo-isómero de 2-dicloroacetamido I-p-nitro, 1-3 propanodiol al igual que los compuestos D-tiomietina, D-AMP-3 y D-Win 5094 son inhibidores activos de esta reacción. Estos tres compuestos son derivados de acción antibiótica resultantes de la sustitución del grupo nitro de la molécula de cloranfenicol por metilsulfonil, aminosulfonil y tiometil respectivamente. Por el contrario, el antípoda óptico del cloranfenicol, el L-treo cloranfenicol, no activo como antibiótico, presenta una acción inhibidora despreciable. Esto indica que la inhibición de la reacción de puromicina por cloranfenicol y por compuestos con diversas sustituciones del grupo p-nitrofenilo del cloranfenicol, muestra la misma estereoespecificidad que el efecto antibiótico.

Del grupo de los macrólidos, espiramicina III, actúa inhibiendo esta reacción, mientras que sus derivados sintéticos neospiramicina III, resultante de la eliminación en espiramicina del azúcar micarosa, así como forocidina III,

TABLA I

EFEECTO DE ANTIBIOTICOS SOBRE LA REACCION DE AC-LEU-trNA CON PUROMICINA.-

Formación de Acetil-leucil-puromicina.

<u>Antibiótico</u>	<u>Concentración</u> <u>Molaridad</u>	<u>% del control</u>	
		<u>10 min.</u>	<u>40 min.</u>
Cloranfenicol	$1,5 \times 10^{-4}$	1	5
D-Tiocimetina	$1,5 \times 10^{-4}$	2	2
D-AMP-3	$1,5 \times 10^{-4}$	0	2
L-Treo-Cloranfenicol	$1,5 \times 10^{-4}$	77	81
Espiramicina III	$1,5 \times 10^{-4}$	61	43
Neospiramicina III	$1,2 \times 10^{-3}$	72	95
Forocidina III	$1,5 \times 10^{-3}$	75	91
Eritromicina	$1,5 \times 10^{-3}$	140	116
Oleandomicina	$1,5 \times 10^{-3}$	130	120
Carbomicina	$1,5 \times 10^{-4}$	5	5
Angolamicina	$1,5 \times 10^{-4}$	30	47
Estreptogramina A	$1,5 \times 10^{-4}$	0	1
Viridogriseina	$1,5 \times 10^{-4}$	76	80
Lincomicina	2×10^{-4}	9	11
Asparomicina	1×10^{-4}	3	4
Amicetina	$1,5 \times 10^{-3}$	3	17
Gougerotina	$1,5 \times 10^{-4}$	6,6	14
Tetraciclina	$1,5 \times 10^{-4}$	81	75
Ac. Fusídico	2×10^{-3}	85	91
Sulfato de polidextra no	$1,5 \times 10^{-6}$	66	72
Pactamicina	2×10^{-4}	150	120
D-Win 5094	$1,5 \times 10^{-4}$	10	35

Mezcla de incubación como en Fig. 3 pero añadiendo los antibióticos que se indican antes de iniciarse la reacción. La concentración de antibiótico fué calculada sobre la base del

volumen de reacción antes de la adición de metanol. El ensayo se efectuó como se indica en la sección de métodos para la reacción de puromicina.

derivado del anterior por eliminación del residuo isomina, son inactivos. Este resultado está de acuerdo con el mayor poder inhibidor de espiramicina III con respecto a neospiramicina III y forocidina III en sistemas de incorporación de aminoácidos dirigidos por polinucleótidos sintéticos (Vázquez, 1967 b).

Eritromicina y su análogo estructural oleandomicina producen una ligera acción estimulante sobre la reacción de Ac-Leu-tRNA con puromicina. Por su parte los otros dos macrólidos ensayados, angolamicina y carbomicina actúan como inhibidores, siendo el primero menos activo que el segundo.

Estreptogramina A, lincomicina, esparsomicina, amice-tina y gougerotina son fuertes inhibidores de esta reacción, mientras que tetraciclina tiene poca actividad a concentraciones que inhibe totalmente síntesis de proteínas (Suárez y Nathans, 1965). Igualmente es poco activo el polianión sulfato de polidextrano, potente inhibidor de la fijación de aa-tRNA a ribosomas (Vázquez, Monro 1967). Este compuesto fué ensayado a baja concentración por el hecho de que a altas concentraciones, al actuar posiblemente como detergente, desorganiza el ribosoma.

La formación de Ac-Leu-puromicina no es afectada por antibióticos como ácido fusídico y pactamicina inhibidores ambos de síntesis de proteínas, el primero por inhibir específicamente el paso de traslocación por fijarse al factor G (Kinoshita, Kawano y Tanaka, 1968), mientras que pactamina parece actuar afectando la estructura del complejo de iniciación (Cohen, Goldberg, Hernec, 1969).

Eritromicina, oleandomicina y pactamicina que producen ligera estimulación de la reacción con puromicina, fueron ensayados en ausencia de metanol, con objeto de averiguar si esta estimulación era debida a que estos antibióticos actuaban por un mecanismo de activación semejante al alcohol. Los resultados obtenidos fueron negativos por lo que parece que ésta hipótesis es descartable. Es posible que el efecto estimulante de eritromicina en la reacción de puromicina utilizando como sustrato Ac-Leu-tRNA sea debido a que su fijación como proponen Teraoka y Tanaka (1971), produzca un cambio de configuración en el ribosoma por el cual quede modificada la fijación del sustrato, la acción peptidiltransferasa y posiblemente la traslocación.

El efecto de distintas concentraciones de los más potentes inhibidores de la reacción es representada en los gráficos de las Figs. 4 y 5. Como puede observarse sobre la base de las concentraciones que producen un 50% de inhibi-

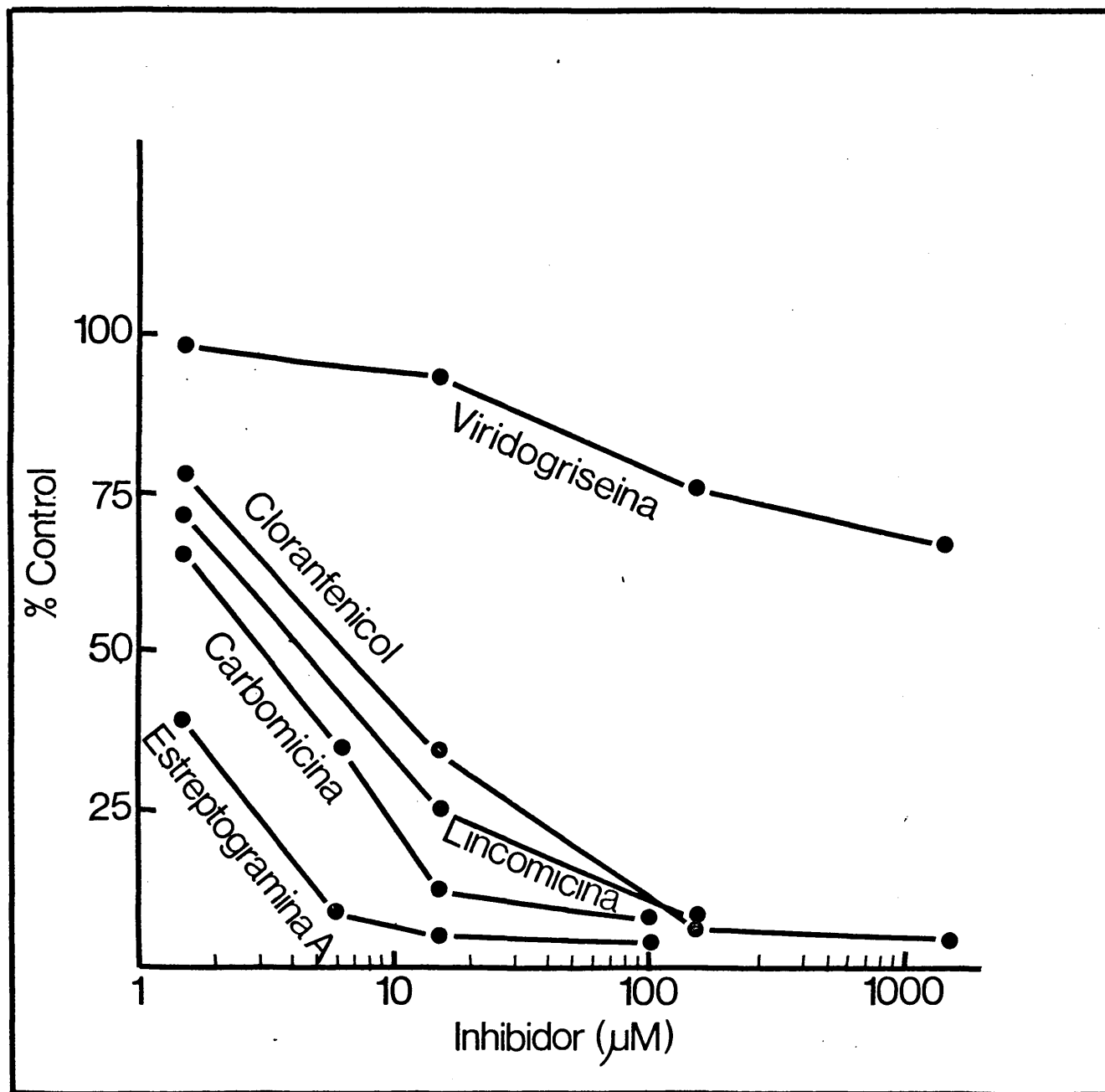


FIG. 4.- Efecto de concentración de inhibidores sobre la reacción de Ac-Leu-tRNA con puromicina. Mezcla de incubación como se indica en la Fig. 3. Tiempo de incubación 15'. La concentración de antibiótico fué calculada sobre la base del volumen de reacción antes de la adición de metanol. Ensayo realizado como se indica en la sección de métodos. En el control reaccionó el 40% de la radioactividad inicial añadida, después de sustracción de la radioactividad extraída a tiempo 0 min.

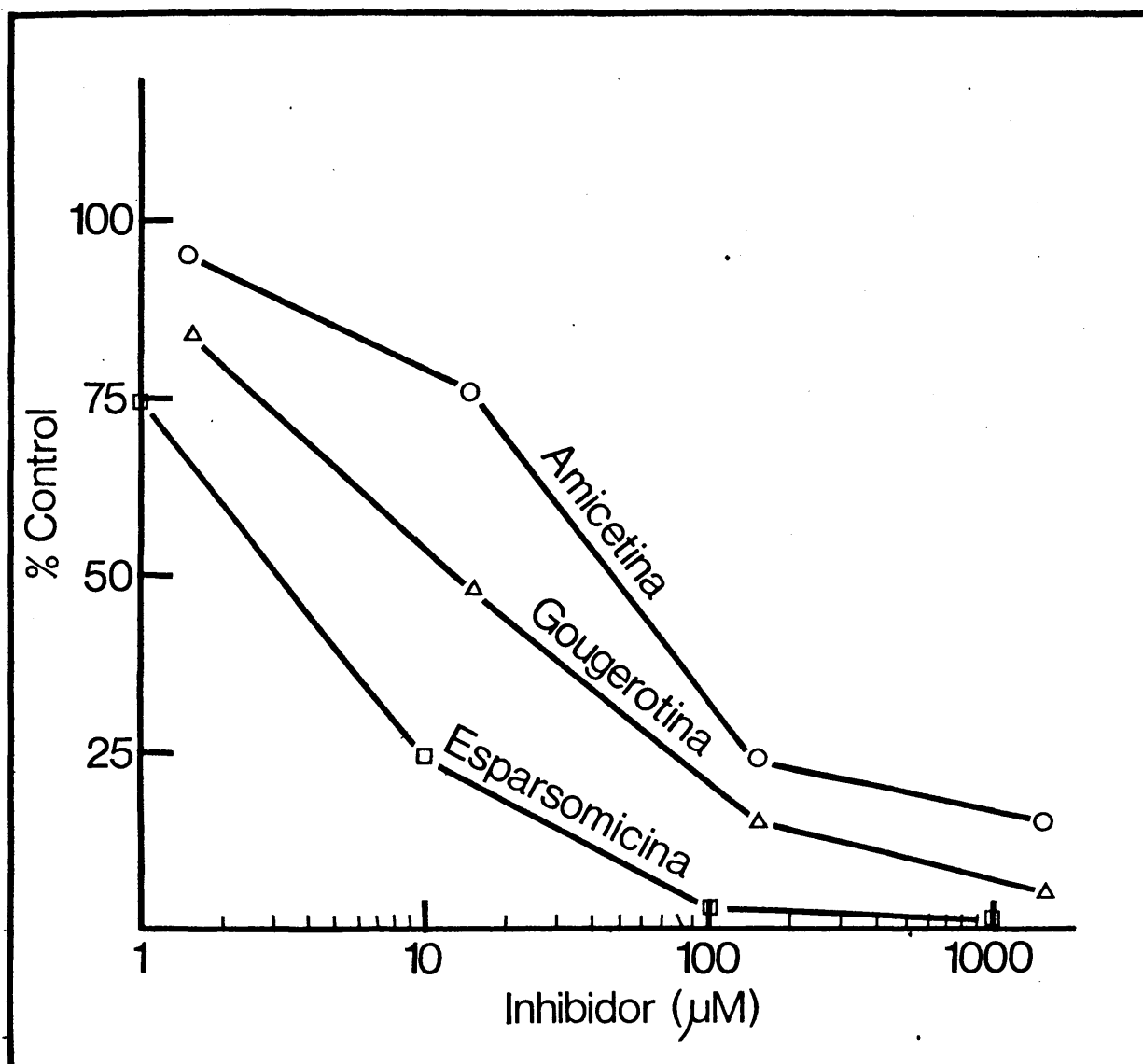


FIG. 5.- Efecto de concentración de esparsomicina gougerotina y amicetina sobre la reacción de Ac-Leu-tRNA con puromicina. Condiciones de ensayo como las de la Fig. 4. El control reaccionó el 42 % de la radioactividad inicial añadida después de sustracción de la radioactividad extraída a tiempo 0 min.

ción, estos antibióticos pueden ordenarse de mayor a menor actividad en el orden estreptogramina A > carbomicina = esparomicina > lincomicina > cloranfenicol > gougerotina > amicetina. Por su parte viridogriseina antibiótico del grupo de estreptogramina B produce, al máximo de concentración ensayado, tan sólo 30% de inhibición.

Efecto comparativo de inhibidores utilizando como sustrato Ac-Leu-tRNA ò CACCA-Leu-Ac.

Empleando las concentraciones de los antibióticos que producen un 50% de inhibición en la formación de enlace peptídico con Ac-Leu-tRNA se estudió el porcentaje de inhibición que producen los mismos antibióticos al utilizar como sustrato donador de la reacción CACCA-Leu-Ac, aligonucleótido terminal de Ac-Leu-tRNA. En este caso y debido al curso más lento de esta reacción (Fig. 6), las condiciones utilizadas para obtener una cantidad de producto medible fueron las mismas condiciones que las empleadas usando como sustrato donador Ac-Leu-tRNA excepto que se incrementó las concentraciones de subunidades hasta la cifra de 1 mg/ml. Se ensayó el efecto inhibidor de antibióticos en la fase lineal de la reacción.

Como puede observarse en la Tabla II, la respuesta de la mayoría de los antibióticos empleados fué prácticamen-

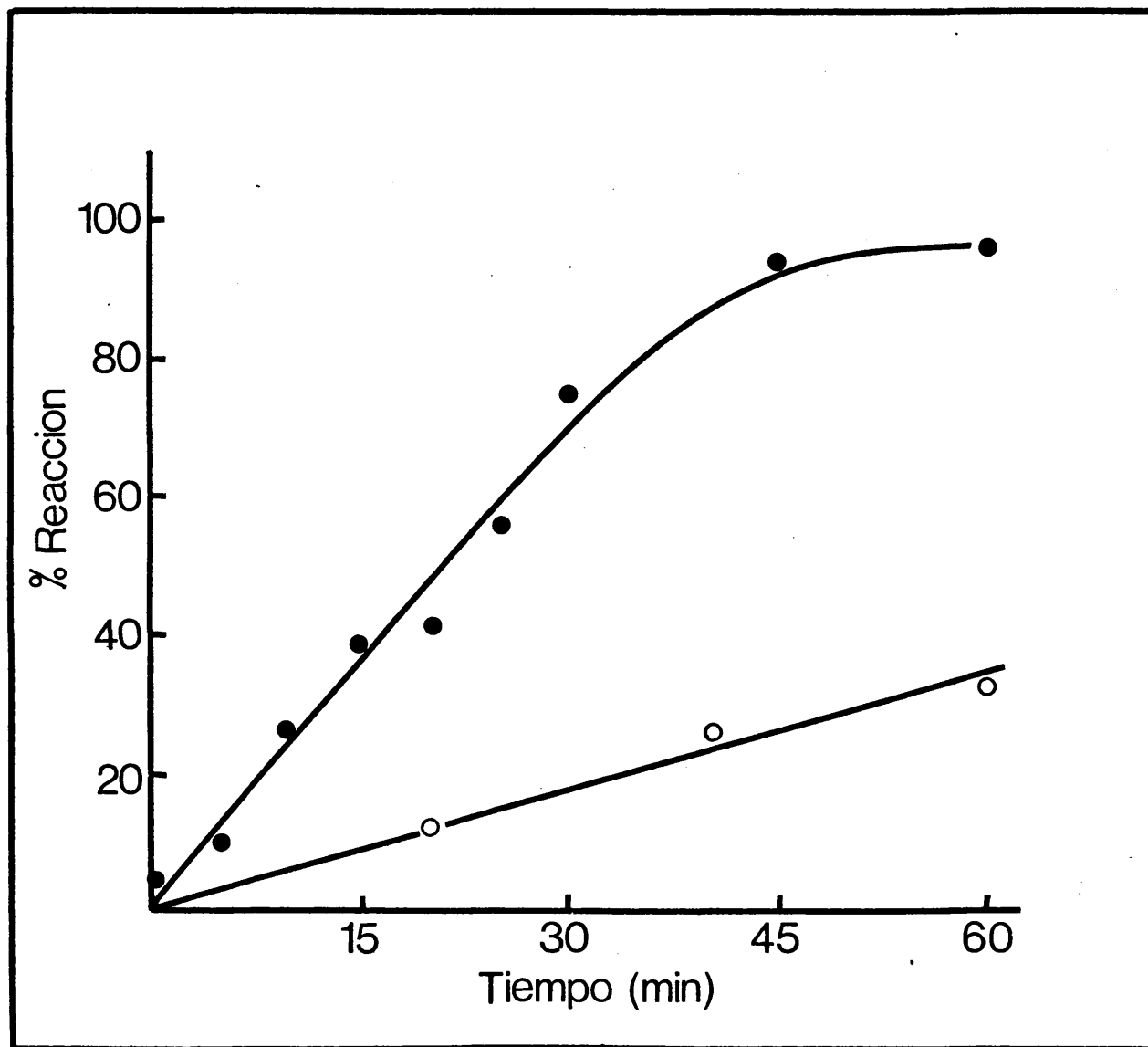


FIG. 6.- Cinética de reacción de CACCA-Leu-Ac con puromicina. Condiciones de ensayo como en Fig. 3, excepto que Ac-Leu-tRNA fue sustituido por 7 μ M CACCA-Leu-(H³)Ac de la misma actividad específica y la concentración de subunidades 50S fue en (●-●) 1 mg/ml y en (○-○) 0,25 mg/ml. A cada tiempo fueron sustraídos los blancos a tiempo 0 min.

TABLA II

INHIBICION DE LA PEPTIDILTRANSFERASA DE 50S POR ANTIBIOTICOS.
EFECTO DEL USO DE DIFERENTES SUSTRATOS

<u>Antibiótico</u>	% de inhibición de formación de		
	Ac-Leu-puromicina		
	<u>Concentración</u>	<u>Sustrato</u>	
	<u>Molaridad</u>	<u>Ac-Leu-tRNA</u>	<u>CACCA-Leu-Ac</u>
Cloranfenicol	6×10^{-6}	50	43
Lincomicina	4×10^{-6}	50	43
Carbomicina	3×10^{-6}	50	44
Estreptogramina A	1×10^{-6}	50	40
Amicetina	4×10^{-5}	50	54
Gougerotina	$1,5 \times 10^{-5}$	50	44
Esparsomicina	3×10^{-6}	50	20

Mezcla de incubación como en la Fig. 3, excepto que en el caso de utilizar CACCA-Leu-Ac se emplearon 1 mg/ml de subunidades 50S y 7 nM de este fragmento. Tiempo de incubación 15 min. El ensayo se efectuó como se indica en la sección de métodos.

te idéntica al utilizar como sustratos el tRNA completo o el oligonucleótido terminal. Sin embargo es de destacar = que esparsomicina inhibe preferencialmente la formación de enlace peptídico cuando se usa como sustrato Ac-Leu-tRNA. Dicha inhibición como aparece en Fig. 7, es mayor en el caso de utilizar como sustrato Ac-Leu-tRNA a lo largo de las distintas concentraciones de esparsomicina ensayadas. Esto sugiere que este antibiótico no sólo interfiere en la interrelación CACCA-Leu-Ac-ribosoma, sino además con otra parte del tRNA, ya sea por un mecanismo alostérico, o porque además se fije este antibiótico a otras partes de la subunidad 50S, o bien a un sitio de 50S con el que interactúan no sólo el CACCA-Leu-Ac terminal sino también otras partes del tRNA.

Antagonismo eritromicina-lincomicina y eritromicina-cloranfenicol en la actividad enzimática peptidil-transferasa.

Eritromicina se fija a la subunidad 50S (Taubman, Jones, Young y Corcoran, 1966). Y parece ser que su inhibición de síntesis de proteínas depende de esta fijación (Oleinick y Corcoran, 1969). En experimentos realizados in vivo por Barber y Waterworth (1964), se ha visto que en cepas de Stafilococcus aureus resistentes a eritromicina, el efecto inhibidor de lincomicina es anulado en presencia de eritromicina. De igual manera en experimentos realizados

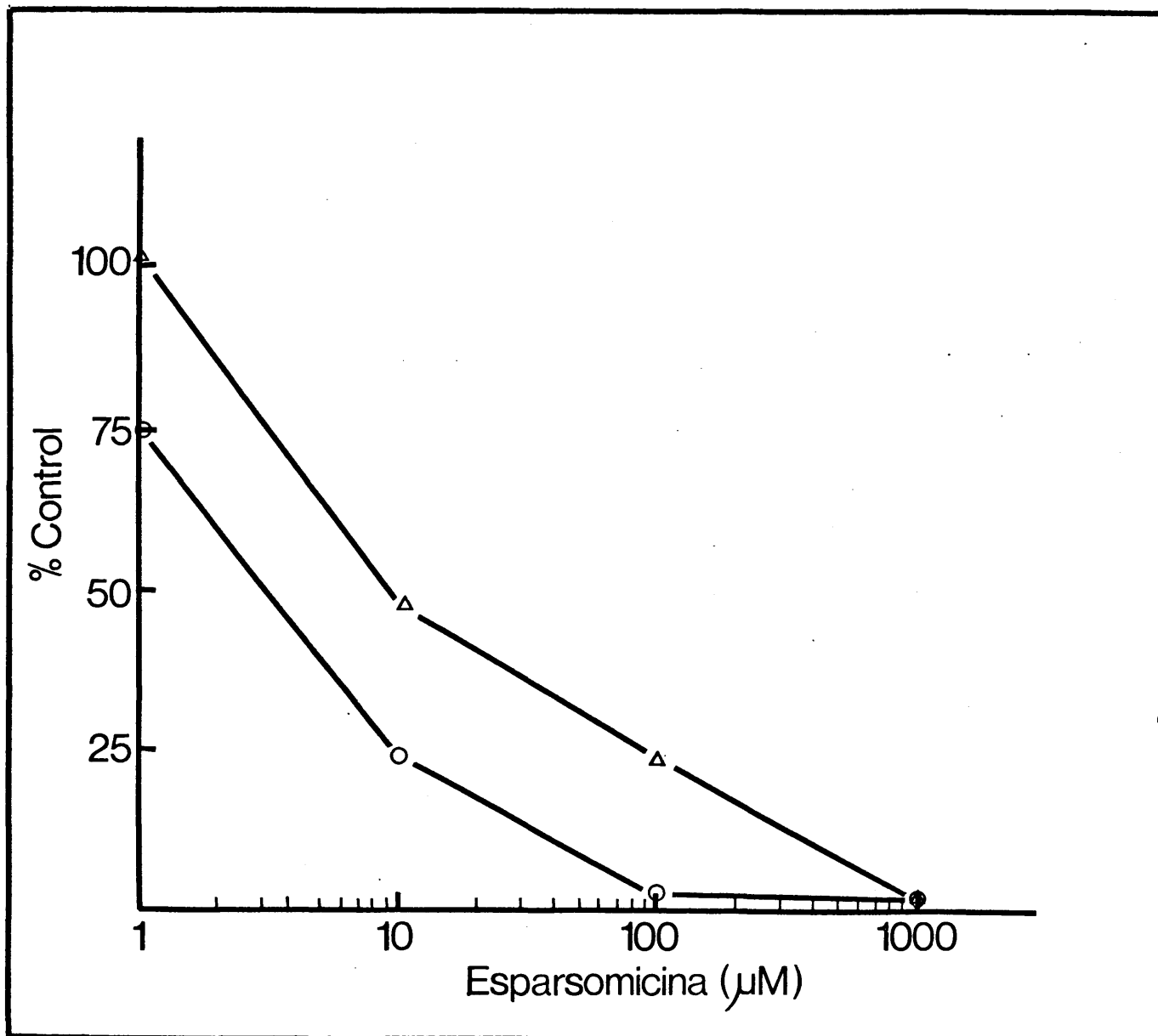


FIG. 7.- Inhibición de peptidiltransferasa por esparsomicina. Efecto del empleo de diferentes sustratos. Mezcla de incubación como en Fig. 3, excepto que en el caso de utilizar CACCA-Leu-Ac.(7 nM) se emplearon 1 mg/ml de subunidades 50S. Tiempo de incubación fué de 15 min. El ensayo se efectuó como se indica en la sección de métodos. En el control en presencia de Ac-Leu-tRNA reaccionó el 45 % de la radioactividad inicial añadida, con CACCA-Leu-Ac la reacción fué del 40%.

(Δ-Δ) sustrato CACCA-Leu(H³)Ac; (o-o) sustrato Ac-Leu(H³)tRNA

in vitro con Bacillus stearothermophilus, Chang y Weisblum (1967), observaron que el efecto inhibidor de lincomicina en síntesis de polifenilalanina dirigido por el mensajero sintético poli U era revertido por eritromicina.

Con objeto de averiguar si este antagonismo podía estar relacionado con la actividad peptidiltransferasa del ribosoma, se enfrentaron estos antibióticos en la reacción de fragmento en presencia de ribosomas 70S y en condiciones standard. Como se ve en la Tabla III, eritromicina aunque no inhibe formación de enlace peptídico, es capaz de anular, cuando se añade simultáneamente con lincomicina, el efecto inhibidor de ésta.

Este resultado está de acuerdo con la inhibición de la fijación de lincomicina por eritromicina, tanto en sistemas carentes de etanol (Chang y Weisblum, 1967), con ribosomas de Bacillus stearothermophilus, como en presencia o ausencia de etanol con ribosomas de E. Coli (Fernández-Muñoz, Tesis doctoral), probando que el antagonismo entre eritromicina y lincomicina está localizado a nivel de su acción sobre peptidiltransferasa y que el sistema empleado aquí es correlacionable con efectos que tienen lugar in vivo.

TABLA III

REVERSION POR ERITROMICINA DEL EFECTO INHIBIDOR DE LINCOMICINA SOBRE LA ACTIVIDAD PEPTIDILTRANSFERASA.

<u>Antibiótico añadido</u>	<u>cpm</u>	<u>% de Reacción</u>
Ninguno	45	3
10^{-3} PM	1580	94
10^{-3} M PM + 10^{-4} M Linc.	80	5
10^{-3} M PM + 10^{-3} M Eritr.	1530	91
10^{-3} M PM + 10^{-3} M Eritr. + 10^{-4} M.Linc 1680		100

La mezcla de reacción en un volumen de 0,150 ml contenía: 1 mg/ml de ribosomas 70S de E. Coli MR-600, 2,5 mM de CACCA-Leu (H^3)Ac (actividad específica aproximada 20 Ci/mmol, Tris-ClH, pH 7,5, 33 mM, acetato magnésico 13 mM, ClK 270 mM, 0,050 ml de etanol y las concentraciones de los antibióticos indicados. El ensayo fué efectuado como se indica en métodos para la reacción de fragmento.

Eritromicina, por otra parte, en un sistema de síntesis de polilisina dirigido por poli A produce la acumulación de péptidos pequeños de lisina, impidiendo la acumulación de polipéptidos. En el mismo sistema, al contrario de lo que sucede con eritromicina, cloranfenicol inhibe casi por completo la acumulación de pequeños péptidos. Ahora bien, si se añaden simultáneamente eritromicina y cloranfenicol, el efecto observado es el mismo que en el caso de la sólo presencia de eritromicina, es decir, queda anulado el efecto del cloranfenicol (Teraoka, Tanaka, Tamaki, 1969). Se ha observado también que eritromicina inhibe totalmente fijación de cloranfenicol (C^{14}) al ribosoma tanto en ausencia (Vázquez, 1966; Wollfe y Hahn, 1965), como en presencia de etanol (Fernández-Muñoz, Tesis doctoral). A la vista de estos trabajos, con objeto de relacionar la interacción de estos antibióticos con el ribosoma, se ensayó paralelamente el efecto de eritromicina y cloranfenicol en la reacción de fragmento. Como se observa en la Tabla IV, eritromicina aunque incapaz de inhibir la reacción, impide el efecto inhibidor de cloranfenicol. Así pues, el antagonismo entre eritromicina y cloranfenicol se sitúa también específicamente en el paso de formación de enlace peptídico, contribuyendo este resultado al esclarecimiento de la interrelación de ambos antibióticos con el ribosoma.

TABLA IV

REVERSION POR ERITROMICINA DEL EFECTO INHIBIDOR DE CLCRANFENICOL SOBRE LA ACTIVIDAD PEPTIDILTRANSFERASA.

<u>Antibiótico añadido</u>	<u>cpm</u>	<u>% de Reacción</u>
Ninguno	50	3
10^{-3} M PM	1930	98
10^{-3} M PM + 10^{-4} M CAP	210	11
10^{-3} M PM + 10^{-3} M Eritr.	1940	98
10^{-3} M PM + 10^{-4} M CAP + 10^{-3} M. Eritr.	1980	100

Ensayo efectuado en las mismas condiciones que el de la Tabla III.

:
Actividad peptidiltransferasa de ribosomas de distintos organismos procarióticos. Su comportamiento frente a distintos antibióticos.

Con objeto de comprobar la generalidad del mecanismo de formación de enlace peptídico en distintos tipos de ribosomas 70S, se ensayó la actividad peptidiltransferasa de ribosomas de organismos representantes de los grupos de bacterias Gram positivas, Gram negativas y algas azules (Taylor, y Storck, 1964), mediante la utilización de la denominada

reacción de fragmento. En la Fig. 8 aparece representado el curso de la formación de Ac-leucil-puromicina utilizando los ribosomas de los organismos mencionados. Como puede observarse los tres tipos de ribosomas ensayados presentan actividad peptidiltransferasa. El hecho de que la extensión de la reacción sea menor en el caso de utilizar los ribosomas de Bacillus subtilis y Anacystis montana, indica la menor actividad de estos ribosomas debida ya sea al tratamiento más drástico que sufrieron las células para la obtención de los ribosomas, o a que estos organismos poseen ribosomas de mayor labilidad, como sabemos ocurre en el caso de Bacillus subtilis (Takeda y Lipmann, 1966).

Igualmente se estudió el efecto inhibitor de una serie de antibióticos activos sobre biosíntesis de proteínas en la formación de enlace peptídico catalizada por los ribosomas de estos microorganismos. Como es sabido, hay algunos antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas que inhiben preferencialmente bacterias Gram positivas o algas azules: (Vázquez y Monro, 1967; Rodríguez-López y Vázquez, 1968). Ello no siempre es debido a diferencias en permeabilidad celular, sino también a diferencias en sus ribosomas, así cloranfenicol y esparsomicina que son igualmente activos en bacterias Gram positivas y Gram negativas, son igualmente inhibidores de formación de enlace peptídico como - puede verse en Tabla V en la que la concentración requerida

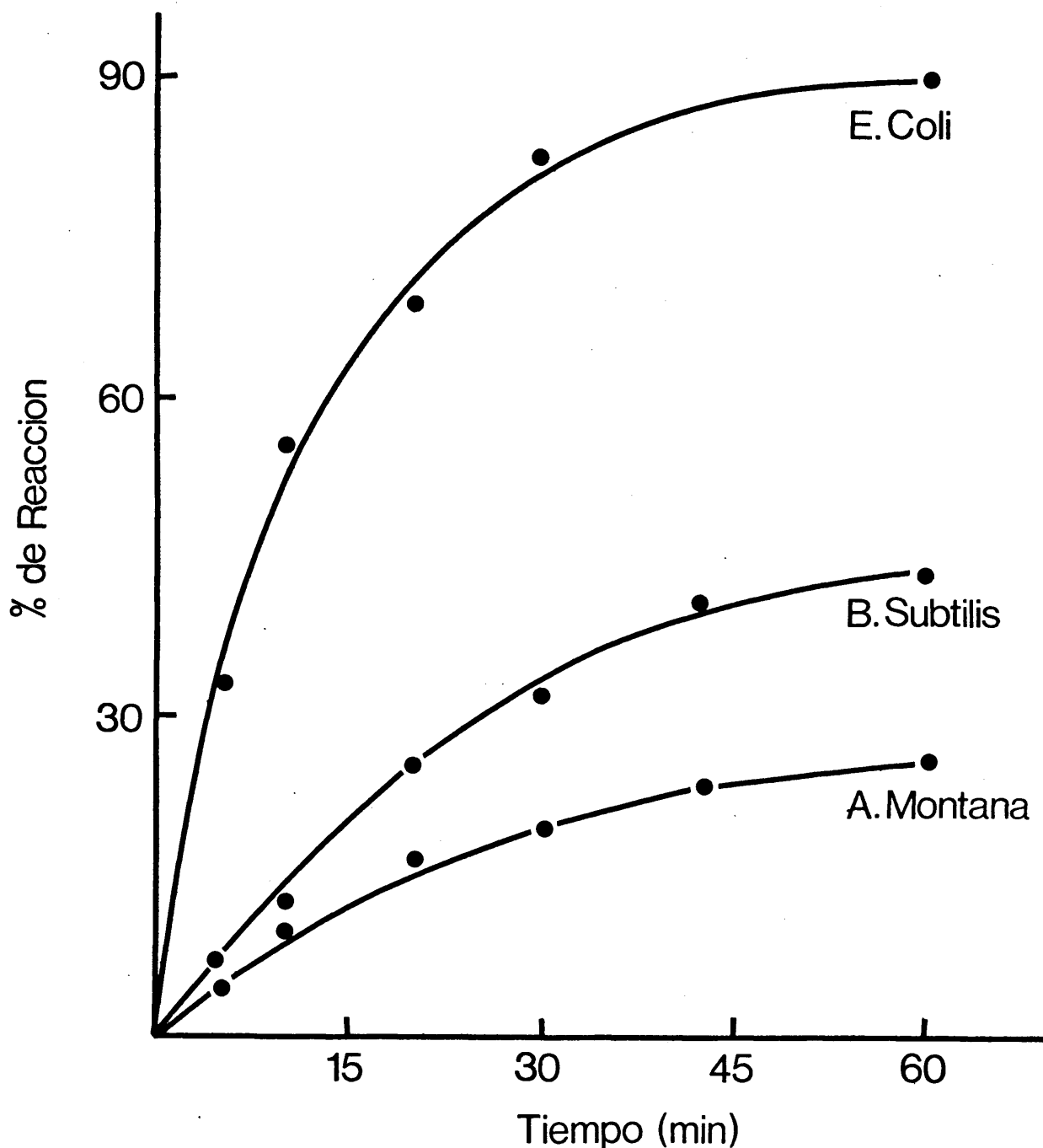


FIG. 8.- Actividad peptidiltransferasa de *E. Coli*, *B. Subtilis* y *A. montana* medida mediante reacción de CACCA-Leu-(H³)Ac con puromicina. Ensayo efectuado en las condiciones de reacción de fragmento indicadas en métodos, utilizándose 1 mg/ml de ribosomas de los organismos indicados, y 7 nM de CACCA-Leu(H³)Ac. En cada punto fueron sustraídos los blancos a tiempo 0 min.

TABLA V

CONCENTRACION (μ M) de ANTIBIOTICOS REQUERIDA PARA INHIBIR LA REACCION DE FRAGMENTO EL 50%.

<u>Antibiótico</u>	Ribosomas de		
	<u>E. Coli</u>	<u>B. Subtilis</u>	<u>A. montana</u>
Cloranfenicol	10	10	10
Estreptogramina A	3	1	2
Lincomicina	6	0,2	2
Esparsomicina	20	20	20

Ensayo efectuado en las mismas condiciones que el experimento de la Fig. 8.

para cada uno de estos dos antibióticos es la misma cuando se utilizan ribosomas de algas azules, bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Por el contrario, la lincomicina y la estreptogramina A preferencialmente activos en bacterias Gram positivas y en algas azules, y como puede observarse en la Tabla V inhiben formación de enlace peptídico preferencialmente cuando se usan ribosomas de estos microorganismos. Ello sugiere que hay una clara diferencia entre ribosomas de bacterias Gram positivas y Gram negativas que

es debida al menos en ciertos casos, al enzima peptidil-transferasa.

CAPITULO II.

SITIOS DE FIJACION DE SUSTRATOS EN EL CENTRO PEPTIDILTRANS-
FERASA DE RIBOSOMAS DE E. COLI.

En este capítulo se ha caracterizado la fijación específica de los sustratos del enzima ribosómico peptidil-transferasa CACCA-Leu-Ac y UACCA-Leu, estudiándose el efecto de inhibidores de biosíntesis de proteínas sobre ambas fijaciones.

Fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas 70S y a sus subunidades.

Con objeto de comparar la acción de antibióticos inhibidores de formación de enlace peptídico con su efecto sobre la fijación del sustrato donador de dicha reacción, se comenzó por ensayar ésta en las condiciones utilizadas para la denominada "reacción de fragmento" pero sin puromicina. Ya que la fijación apreciable de CACCA-Leu-Ac al ribosoma, es muy pequeña, aunque significativa en las mencionadas condiciones, se ensayaron modificaciones tendentes a hacerla cuantificable.

Como puede verse en la Tabla VI, la fijación aumenta con la concentración de etanol; del mismo modo aumenta la fijación no inhibible por estreptogramina A. En experimentos posteriores debido a que la afinidad de algunos antibióticos

TABLA VI

FIJACION DE CACCA-Leu-Ac A RIBOSOMAS: EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ETANOL.

<u>% Fijación de radioactividad añadida</u>			
<u>% Etanol</u>	<u>Sin antibiótico</u>	<u>Con estreptogramina A 0,1 mM</u>	<u>Diferencia</u>
0	0	0	0
33	15	3	12
50	48	23	25
60	70	30	40

Se utilizaron 3 mg/ml de ribosomas 70S. El tiempo de incubación fué de 20 minutos. Las otras condiciones y la manera de efectuar el ensayo se indica en la Fig. 9

por el ribosoma quedaba afectada por concentraciones de etanol superiores al 50% (v/v), se utilizó dicha concentración de alcohol como standard. El papel del etanol aunque todavía no aclarado, está siendo utilizado en la actualidad en numerosos laboratorios, tanto en estudios de formación de enlace peptídico (Silvertein, 1969), (Tompkins, 1970), como en terminación de síntesis de proteínas in vitro (Tompkins, Scolnick y Caskey, 1970) y es además ampliamente empleado en la obten-

ción de subunidades ribosómicas (Staehelin y col., 1969). El efecto del etanol como el de otros alcoholes utilizados (Monro y col., 1969), ha sido postulado, puede ser debido a la modificación de la estructura del ribosoma activando el enzima peptidiltransferasa, lo que se traduciría en este caso por el aumento de afinidad del sustrato por el enzima.

Como se indica en la Fig. 9, la fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas, aumenta también al aumentar la concentración de éstos, no llegándose aún a concentraciones de subunidades 50S de 12 mg/ml, equivalentes a 6 μ M y en presencia de 1 a 2 mmoles de sustrato a alcanzar la saturación del sistema, lo que da idea de la baja afinidad del sustrato por el ribosoma.

Como muestra el experimento de la Tabla VII, la fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas 70S subunidades 50S y 30S alcanza los valores de 50%, 50% y 18% respectivamente, en presencia de 50% (v/v) de etanol variando la extensión de la fijación con distintas preparaciones de ribosomas. La adición de 0,1 mM de estreptogramina A baja la fijación a 25 y 15% en el caso de 70S y 50S, no teniendo ningún efecto sobre la fijación a 30S. La fijación revertida en presencia de

FIG. 9.- Fijación de CACCA-Leu-Ac a subunidades 50S. Efecto de la concentración de subunidades. La mezcla de incubación contenía en un volumen de 0,150 ml: CACCA-(H³)Leu-Ac 2 nM (actividad específica aproximada 20 Ci/mmol, (Ac)₂ y 13 mM, ClK 270 mM, Tris-ClH pH 7,5 40 mM, y ribosomas en la concentración indicada y 50 % (v/v) de etanol. El tiempo de incubación fué de 20 min. En ensayo se efectuó como se indica en la sección de métodos.

(●-●) sistema completo; (○-○) sistema completo más 0,1 mM de estreptogramina A.

FIG. 10.- Cinética de fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas 70S. La mezcla de incubación contenía los mismos componentes que la Fig. 9, excepto que se utilizaron 3 mg/ml de ribosomas 70S. Se efectuó el ensayo como se indica en métodos, centrifugando los 5 min. a 35000 g y 4º C.

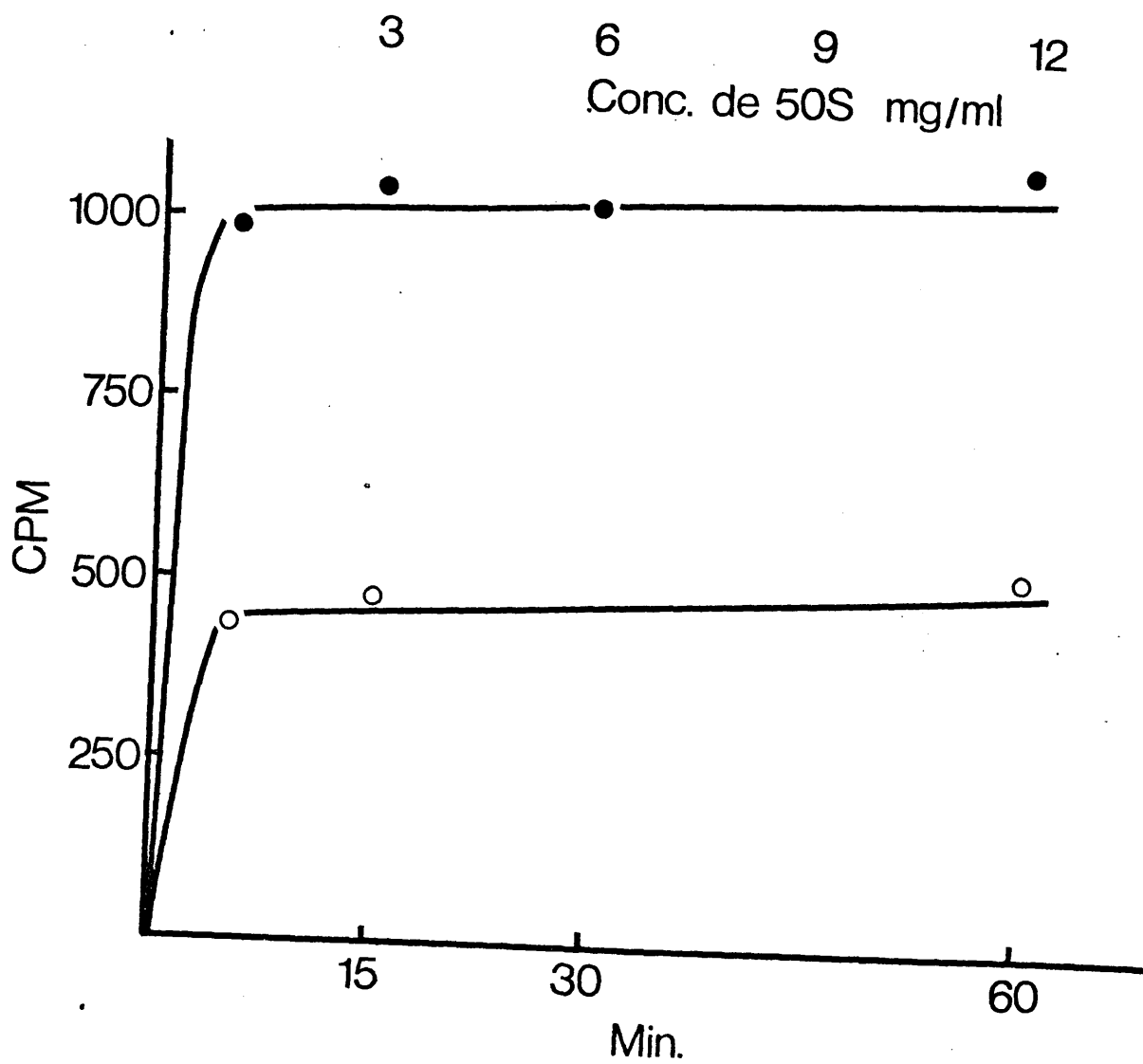
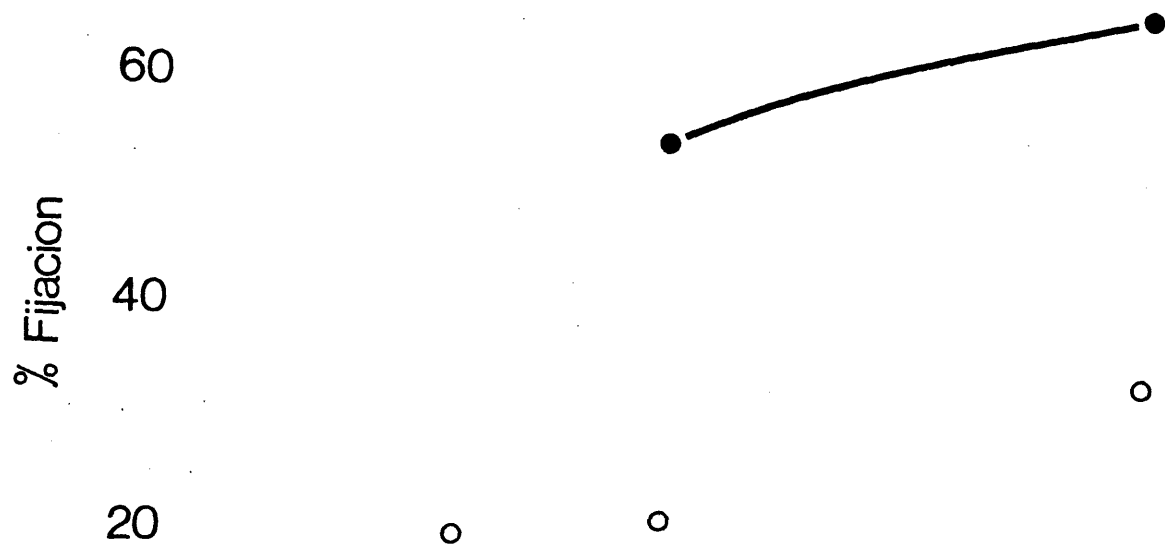


TABLA VII

FIJACION DE CACCA-Leu-Ac A RIBOSOMAS 70S Y A SUSSUBUNIDADES

% Fijación de radioactividad añadida

<u>Ribosomas</u>	<u>Sin antibiótico</u>	<u>Con estreptogramina A 0,1 mM</u>	<u>Dife-</u> <u>rencia</u>
70S	50	25	25
50S	50	15	35
30S	18	19	-1

Se utilizaron ribosomas 70S o sus subunidades a una concentración de 3 mg/ml. El tiempo de incubación fué de 20 minutos. Las otras condiciones y la manera de efectuar el ensayo se indica en la Fig. 9.

estreptogramina A será la que tenga lugar en el sitio del ribosoma sensible a dicho antibiótico. El resto de Ac-Leu-T₁ unido a 70 y 50S, así como el fijado a las subunidades 30S, es probablemente debido a interacciones no específicas con el enzima peptidiltransferasa.

Los ribosomas 70S presentan en general a lo largo de los experimentos efectuados, fijación no específica más alta que las subunidades 50S, siendo cuantitativamente similar

la fijación específica a ambas partículas al hacer las correcciones de molaridad adecuadas. Por otra parte, la cinética de fijación a 70S (Fig. 10), es muy rápida y similar a la de fijación a 50S (no mostrada), alcanzándose el equilibrio en los diez primeros minutos de incubación. En este tipo de experimentos con objeto de parar lo más rápidamente posible la fijación, las muestras incubadas durante el tiempo indicado fueron centrifugadas a 35.000 g durante 5 min. a 4°C, procediéndose a continuación a la estimación de la radioactividad fijada como se indica en métodos.

a) Requerimiento iónico.

Descrita la necesidad de iones Mg^{++} e iones monovalentes NH_4^+ ó K^+ para la formación de enlace peptídico (Maden y Monro, 1968), se procedió al estudio del efecto de estos iones sobre la fijación de nuestro sustrato a ribosomas 70S y 50S. Como se ve en Tabla VIII, tanto los ribosomas 70S como las subunidades 50S son reversiblemente inactivadas en ausencia de Mg^{++} siendo mayor el requerimiento de este ión para la fijación de CACCA-Leu-Ac a 50S. La mezcla de incubación en presencia o ausencia de Mg^{++} contenía 50S o 70S en una concentración final de 3 mg/ml. En experimento I con objeto de que el Mg^{++} presente en la solución fuera lo menor

TABLA VIII

REQUERIMIENTO DE IONES Mg^{++} EN LA FIJACION DE CACCA-Leu-Ac
A RIBOSOMAS 70S y 50S.

% Fijación de la radioactividad añadida

<u>Ribosomas</u>	<u>Incubación</u>	<u>Sin anti- bióticos</u>	<u>Con estreptogra- mina A 0,1 mM</u>
Exp.I. 50S	Sistema completo	34	13
	menos Mg^{++}	8	10
	70S Sistema completo	39	10
	menos Mg^{++}	25	19
Exp.2. 70S	Sistema completo	41	14
	menos Mg^{++}	17	15

Las mezclas de incubación contenían 3 mg/ml de ribosomas tratados como se indica en el texto. Los demás componentes de la mezcla fueron como los que se señalan en la Fig. 9, excepto que fué omitido el ión Mg^{++} de la mezcla salida donde se apunta en la tabla. El tiempo de incubación fué de 20 minutos. No fué necesario la ultracentrifugación de ribosomas en ausencia de magnesio, ya que a la concentración de etanol empleada, la precipitación de ribosomas es cuantitativa.

posible, los ribosomas de partida fueron inicialmente concentrados por ultracentrifugación hasta 75 mg/ml. De esta manera la cantidad de Mg^{++} en la mezcla de incubación debida a la solución tampón en la que están resuspendidos los ribosomas es de 0,4 mM. Teniendo en cuenta que a 10 mM Mg^{++} (Goldberg 1966) se une una molécula de magnesio por cada dos grupos fosfato, y que existen 4820 grupos fosfatos por 70S estará unido a los ribosomas 2,6 mM Mg^{++} aproximadamente, - con lo que la concentración final de este ión en la mezcla de incubación será de 3 mM. En estas condiciones como se - aprecia en Tabla VIII, las subunidades 50S no son capaces de fijar CACCA-Leu-Ac, por el contrario los ribosomas 70S fijan parcialmente dicho sustrato. En vista de este resultado, con el fin de disminuir el Mg presente en la reacción, los 70S se pasaron en un volumen de 0,5 ml por una columna de Sephadex G-50 fino de 6 ml equilibrada previamente con solución tampón standard en ausencia de Mg. De este modo (experimento 2), aunque los ribosomas no han perdido la capacidad de fijación al incubarlos en presencia de Mg^{++} , la fijación específica es nula en su ausencia. El hecho de que la inactivación sea reversible, hace suponer que sea debida más a un despliegue o cambio de estructura del ribosoma que a la disociación o desprendimiento de alguno de sus constituyentes.

El estudio del requerimiento de iones monovalentes para la fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas, fué dificultoso, ya que después de eliminar estos iones del medio, la mayor parte de las preparaciones de ribosomas 70S y sobre todo las de sus subunidades 50S, perdían irreversiblemente su actividad.

En los experimentos descritos por Miskin, Zamir y D. Elson (1968), se observó que los ribosomas privados de K^+ recuperaban su actividad peptidiltransferasa cuando eran calentados previamente en presencia de estos iones, similarmente en nuestros experimentos, como se ve en la Fig. 11 el calentamiento acelera el proceso de reactivación. Igualmente Traut y Nomura (1968), en experimentos de reconstitución de subunidades 30S a partir de sus proteínas y del 16S RNA necesitan del calentamiento de los constituyentes en altas concentraciones de K^+ . Por esta razón en los ensayos descritos en Tabla IX, las subunidades 50S y los ribosomas 70S una vez pasados por columna de 7 ml de Sephadex G-25 fino, en ausencia de iones monovalentes fueron calentados antes de iniciar la reacción en presencia o no de estos iones. Como puede verse, la fijación de CACCA-Leu-Ac a 50S depende en estas condiciones de la presencia del ión potasio, siendo la fijación a 70S menos dependiente de este ión. El que la fijación

FIG. 11.- Efecto del calentamiento sobre la actividad peptidiltransferasa de subunidades 50S. El ensayo se efectuó como se indica para la reacción de fragmento en la sección de métodos, conteniendo la mezcla de incubación en un volumen de 0,150 ml la concentración de sales standard, 2 nM de CACCA (H^3)Leu-Ac y 1 mg/ml de subunidades 50S pasadas por columna de Sephadex G-25 fino equilibrado con solución tampón en ausencia de K^+ (Tris-ClH pH 7,5 100 mM, $(Ac)_2Mg$ 10 mM, β ME 5 mM). En el ensayo (●-●) los ribosomas antes de iniciar la reacción fueron calentados 20 min. a 34°C en presencia de 0,1 M de NH_4^+ . En (○-○) se les añadió el ión NH_4 pero no fueron posteriormente calentados. Fueron sustraídos a cada tiempo los blancos de ausencia de puromicina.

FIG. 12.- Estabilidad del complejo CACCA-Leu-Ac.ribosomas. La formación del complejo se efectuó en las condiciones que se indican en métodos, empleándose 4 mg /ml de ribosomas 70S, 6000 cpm de CACCA-Leu(H^3)Ac y 50 % (v/v) de etanol. El ensayo se realizó como se indica en el texto. La línea discontinua representa la radioactividad fijada inicialmente en presencia de 0,1 mM de estreptogramina A. Los lavados se efectuaron en ausencia (○-○), o en presencia (●-●) de iones K^+ .

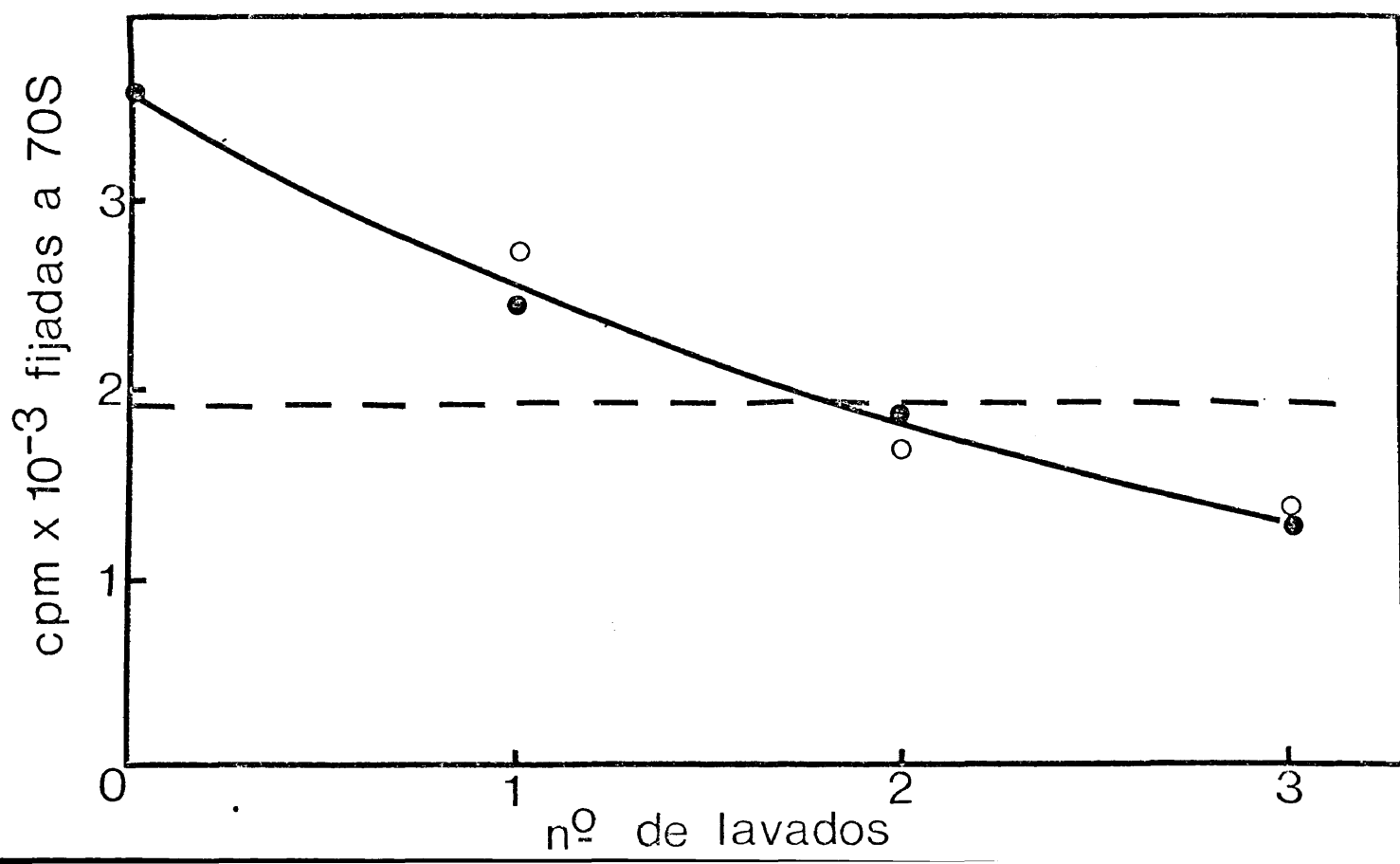
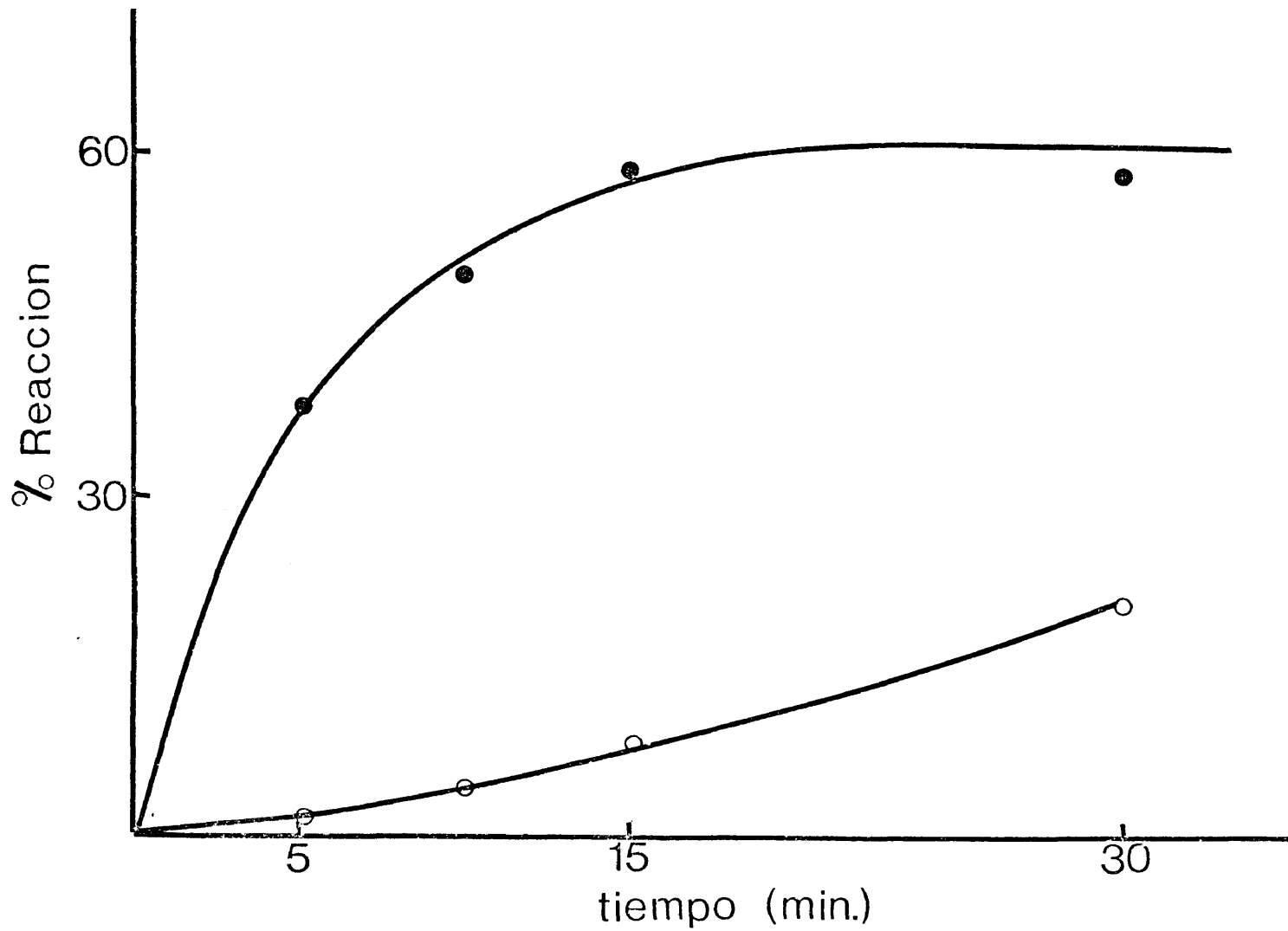


TABLA IX

REQUERIMIENTO DE IONES K^+ EN LA FIJACION DE CACCA-Leu-Ac
A RIBOSOMAS 70S y 50S.

% Fijación de la radioactividad añadida

<u>Ribosomas</u>	<u>Incubación</u>	<u>Sin antibiótico</u>	<u>Con estreptogramina A 0,1 mM</u>
50S	Sistema completo	40	15
	menos K^+	14	17
70S	Sistema completo	36	7,5
	menos K^+	26	28

Las mezclas de incubación contenían 2 mg/ml de subunidades 50S y 3 mg/ml de ribosomas 70S tratados como se indica en el texto, omitiendo la presencia de potasio en donde se señala. Las demás condiciones y la forma de ensayo fué como se indica en Fig. 9. El tiempo de incubación fué de 20 minutos.

en ausencia de K^+ no sea revertida por estreptogramina A, es debido posiblemente a que este antibiótico no se fije en estas condiciones, ya que se ha visto (Ennis, 1971), es necesaria la presencia de este ión para que se produzca su fijación en sistemas sin etanol.

b) Reversibilidad del complejo.

Como se ha mostrado la interacción entre CACCA-Leu-Ac y ribosomas 70S y subunidades 50S tiene lugar rápidamente alcanzándose el equilibrio en menos de 10 minutos a 0°C; que esta interacción es reversible, se deduce por los siguientes hechos: A) su inestabilidad frente a la dilución; B) la capacidad de estreptogramina A de producir la salida de Ac-Leu- T_1 del ribosoma, una vez que ha tenido lugar la formación del complejo.

A) Inestabilidad frente a la dilución (Fig. 12): Después de formado el complejo en condiciones standard fué separado del resto de la mezcla de reacción por centrifugación y eliminación del sobrenadante, siendo sometido a continuación a sucesivos lavados. Los lavados se efectuaron con la misma solución empleada en la fijación de un volumen doble al empleado en aquella. Durante el tiempo de lavado se agitó la mezcla enérgicamente durante unos minutos en mez

clador. A continuación se sedimentaron de nuevo los ribosomas por centrifugación 20 min. a 5.000 g y se estimó la cantidad de CACCA-Leu-Ac desprendido después de cada uno de los tratamientos por lectura de la radioactividad en cada uno de los líquidos de lavado. Se representó con línea discontinua la fijación inicial en presencia de estreptogramina A. Como puede apreciarse, tanto si las diluciones se han efectuado en presencia como en ausencia de K, se va produciendo un progresivo desprendimiento de radioactividad, que abarca no sólo a la fijación inespecífica, supuesto que ésta sea la primera que se pierda en los lavados.

La inestabilidad del complejo se hizo también patente en experimentos en los que se intentaba su detección por el método de filtración. En este método la muestra era diluída unas 6 veces, filtrada por filtros Whattman GF-C y lavada por dos veces con 2 ml de la misma mezcla de solución tampón-sales; en estas condiciones aunque los ribosomas quedaban retenidos en un 100% por los filtros, no existía retención apreciable de radioactividad, indicando que la dilución había revertido la fijación de CACCA-(H³) Leu-Ac a ribosomas.

B) Reversibilidad por estreptogramina A: El hecho (Tabla X) de que la presencia de estreptogramina A en la mezcla de incubación después de formado el complejo (muestra 5), revierta la fijación en la misma extensión que cuando la adición de este antibiótico se hace simultáneamente a la del sustrato (muestra 4), corrobora que la fijación específica de CACCA-Leu-Ac a ribosomas es reversible. Se efectuaron controles (muestras 1, 2) para demostrar que durante los 10 minutos de preincubación no se produjo inactivación del sistema.

c) Identificación del producto.

Con el fin de averiguar si el sustrato permanece como tal o si sufre alguna modificación al interaccionar con las subunidades 50S, se procedió a la identificación del producto resultante de esta interacción por electroforesis en papel. Para ello se fijó CACCA-(H³) Leu-Ac a 50S en condiciones standard en presencia o ausencia de estreptogramina A, utilizando volúmenes de reacción de 0,4 ml y concentraciones de sustrato de 7 nM. El complejo formado se aisló, disoció por resuspensión en 0,6 ml de Mg⁺⁺ 0,1 mM y el eluido fué sometido a electroforesis en papel junto con un control de CACCA-(H³)Leu-Ac previa eliminación de los ribosomas por ultracentrifugación. En el eluido se recuperó el

TABLA X

REVERSIBILIDAD DEL COMPLEJO.

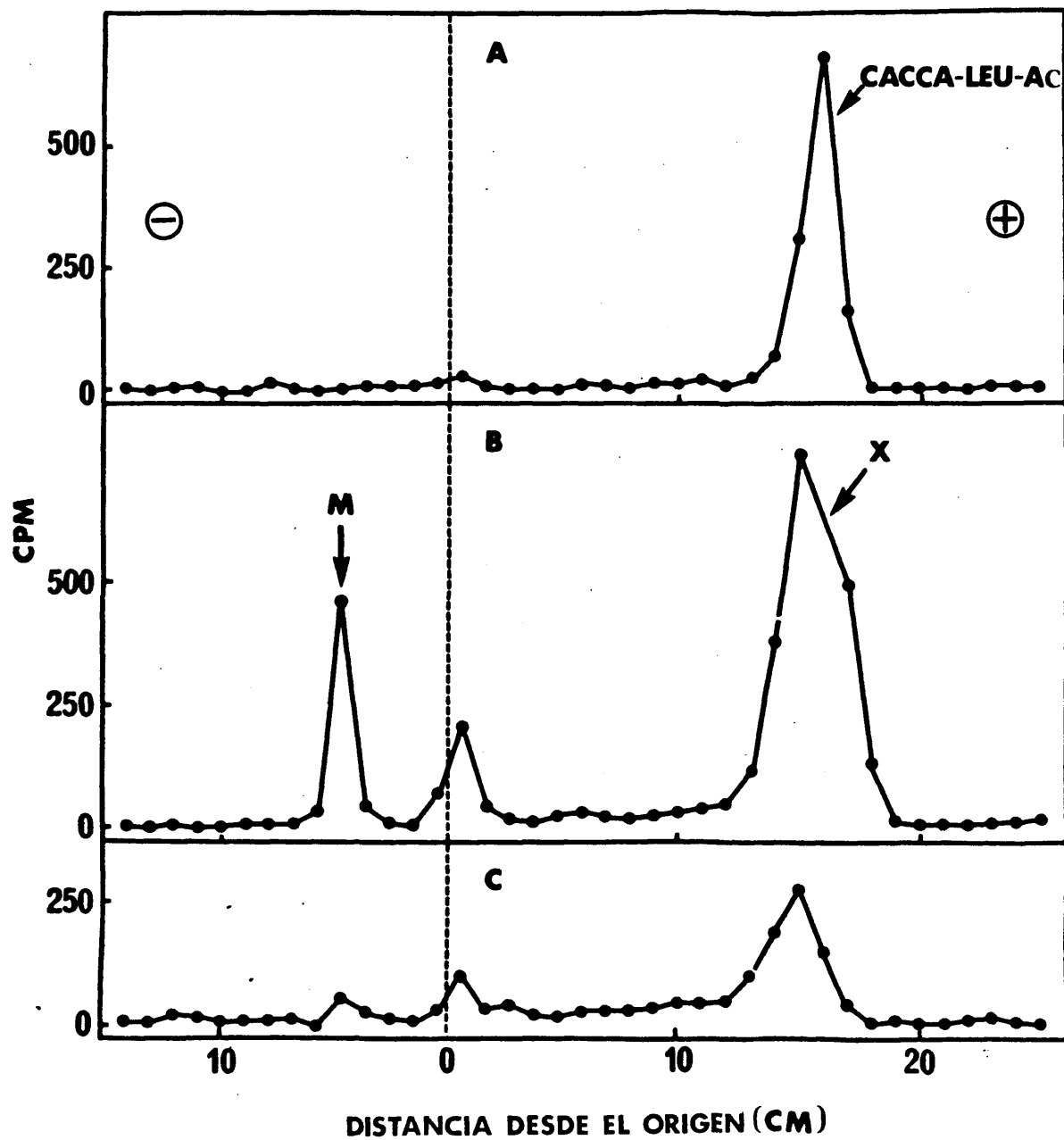
	<u>Tiempo de incubación(min.)</u>	<u>Adiciones a tiempo</u>	<u>% Fijación de la radioactividad añadida</u>
1	10	---	36
2	10	Estreptogramina A 0,1 mM a 0 min	17
3	20	---	39
4	20	Estreptogramina A 0,1 mM a 0 min	19
5	20	Estreptogramina A 0,1 mM a 10 min	20

La concentración de ribosomas 70S empleados fué de 3,5 mg/ml, siendo las condiciones y métodos de ensayo como se indica en Fig. 9. Para evitar la dilución de la mezcla de incubación, se añadió esta al tiempo indicado sobre tubo conteniendo la estreptogramina A desecada.

100 % de la radioactividad fijada a los ribosomas. En la Fig. 13 se muestra que a pH 6,5 aproximadamente un 70 % de la radioactividad "X" se mueve como una banda única a la misma velocidad que el marcador.

Alrededor de 18% de la radioactividad corre en otra banda "M" hacia el polo opuesto, pudiendo ser debida a un producto de degradación como es Ac-Leu-adenosina y el 10% de la radioactividad permanece fijada al origen. El eluato del complejo formado en pre-

FIG. 13.- Ionograma (pH 6,5) de (A) marcador de CACCA-(H³) Leu-Ac; (B) elución del complejo de CACCA-(H³)Leu-Ac y 50S y (C) como "B" pero complejo se formó en presencia de 0,1 mM de estreptogramina A. Las condiciones de incubación para la formación del complejo fueron como en Fig. 9, pero con 7 nM de CACCA-Leu-Ac, 3 mg/ml de subunidades 50S y un volumen de 0,4 ml. Después de la incubación, la muestra fue centrifugada y el sedimento disuelto en 0,6 ml de (Ac)₂ Mg 0,5 mM. La solución de ribosomas se incubó durante 5 min a 25°C para asegurar la ruptura del complejo y se centrifugó a 150.000 g durante 3 horas. La fracción no sedimentable se liofilizó, redisolvió en agua y fue sometida a electroforesis en papel Whatman 52 a pH 6,5 durante 1 hora a 55 v/cm. Se procedió para la estimación de radioactividad como se indica en métodos. Aproximadamente se unió al ribosoma en el sistema completo un 57 % del CACCA-Leu-Ac añadido y 20 % en la incubación con estreptogramina A.



sencia de estreptogramina A contenía los mismos componentes en muy reducida cantidad. De ello se puede deducir que CACCA-Leu-Ac al fijarse a ribosomas lo hace en un sitio sensible a estreptogramina A, no sufriendo cambios de tipo covalente, ya que éstos quedarían reflejados por la distinta movilidad que conferirían a la molécula.

Fijación de UACCA-Leu a ribosomas 70S y sus subunidades.

Con el fin de caracterizar la fijación de sustrato a sitio A (aceptor) del centro peptidiltransferasa y dado el conocimiento actual de biosíntesis de proteínas, se procedió al estudio de la fijación de UACCA-Leu ó CACCA-Leu a ribosomas. Dicho sustrato al tener el grupo NH_2 del aminoácido libre, puede considerarse a priori como sustrato aceptor en la formación de enlace peptídico.

En los ensayos de la tabla XI se aprecia que en las condiciones empleadas para la fijación de Ac-Leu- T_1 la fijación de UACCA-Leu a 70S, 50S y 30S es del 69%, 33% y 10% respectivamente, siendo la cantidad de radioactividad fijada variable, dependiendo de la preparación de ribosomas empleada. La fijación a 70S y 50S baja hasta 0-12% cuando la incubación se realiza en presencia de 1 mM de cloranfenicol, no teniendo este antibiótico ningún efecto sobre la fijación de subunidades 30S.

TABLA XI

FIJACION DE UACCA-Leu A RIBOSOMAS Y SUS SUBUNIDADES: EFECTO DE CLORANFENICOL.

% Fijación de radioactividad añadida

	Ribosomas	Sin antibiótico	Con cloranfenicol 1 mM	Diferencia
Exp. 1	70S	69	12	57
	50S	33	6	27
	30S	10	13	-3
Exp. 2	50S	40	0	40

Se emplearon 3 mg/ml de ribosomas o de sus subunidades. Tiempo de incubación fue de 20 minutos. Otras condiciones y método de ensayo como se indica en Fig. 14.

De aquí se desprende que la fijación de la mayor parte de UACCA-Leu tiene lugar en un sitio sensible a cloranfenicol y debido a que este antibiótico actúa sobre el centro peptidiltransferasa a esta fijación es a la que se denominará fijación específica. Los mismos resultados se obtuvieron empleando CACCA-Leu en lugar de UACCA-Leu.

La fijación de este sustrato es dependiente de la concentración de ribosomas presentes en la incubación (Fig. 14) y para que se produzca es necesario en las condiciones iónicas empleadas la presencia de etanol (Tabla XII); ahora bien, la dependencia de alcohol para la fijación a 70S no es tan marcada como en el caso de fijación del sustrato acetilado.

TABLA XII

FIJACION DE UACCA-Leu A RIBOSOMAS 70S Y A SUS SUBUNIDADES 50S
EFECTO DE LA CONCENTRACION DE ETANOL

<u>% Fijación específica</u>			
<u>Ribosomas</u>	<u>50% etanol</u>	<u>33% etanol</u>	<u>0% etanol</u>
70S	57	44	0
50S	27	16	0.

Se emplearon 3 mg/ml de ribosomas 70S de subunidades 50S. El tiempo de incubación fué de 20 min. Otras condiciones y método como se indica en Fig. 14. El porcentaje de fijación se corrigió para la fijación no específica por sustracción de las obtenidas en incubaciones en paralelo con 1 mM de cloranfenicol.

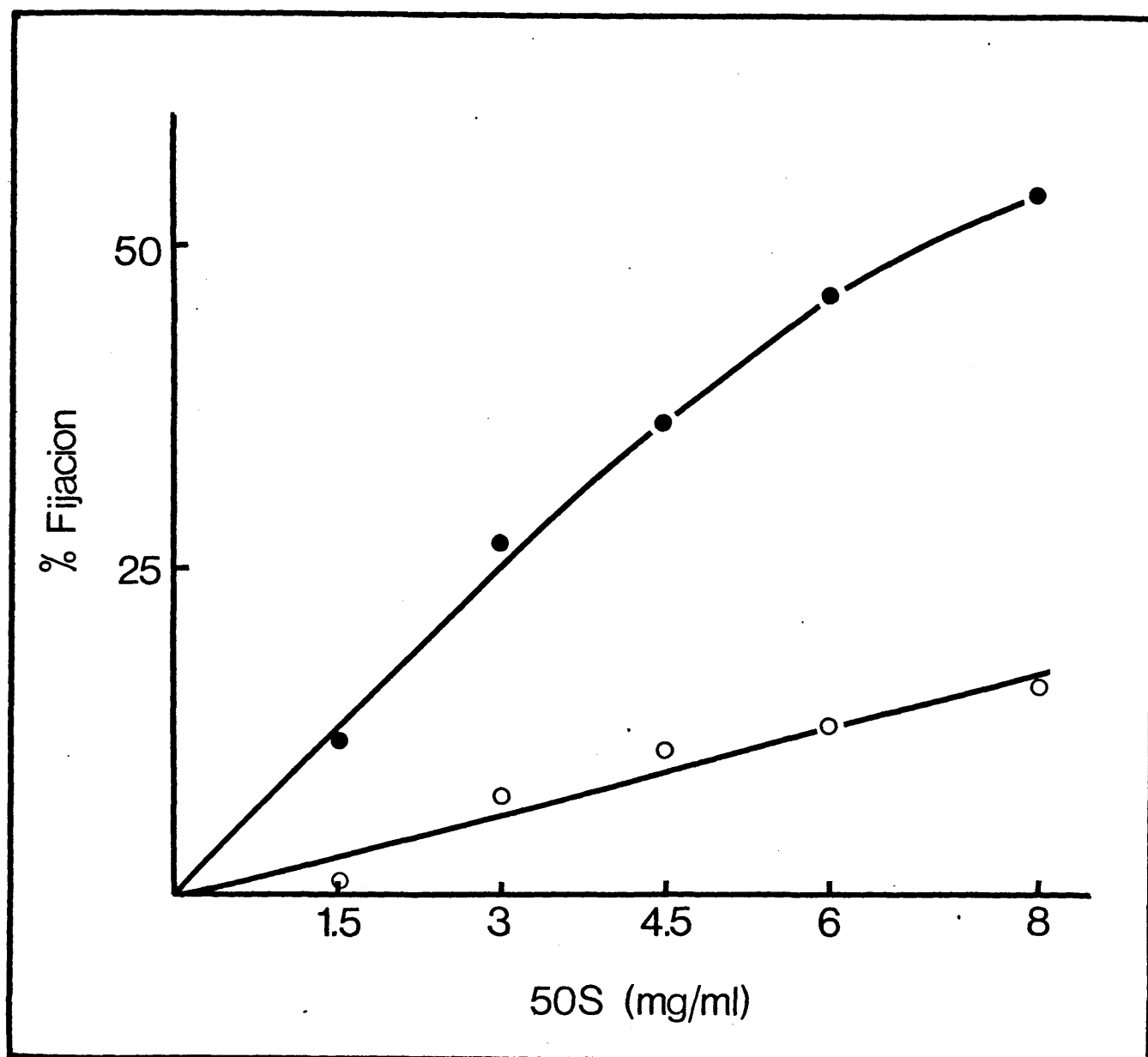


FIG. 14.- Fijación de UACCA(H^3)Leu a subunidades 50S: efecto de la variación de concentración de subunidades. La mezcla de incubación en un volumen de 0,150 ml contenía: UACCA(H^3)Leu 2 nM (actividad específica aproximada 20 Ci/mmol, $(Ac)_2Mg$ 13 mM, ClK 270 mM, Tris-ClH pH 7,5 40 mM, ribosomas en la concentración indicada y 50 % (v/v) de etanol. El tiempo de incubación fué de 10 min. siendo entonces las muestras centrifugadas 5 min. a 35000 g a 4°C, y continuándose el ensayo como se indica en la sección de métodos.

(●-●) Sistema completo; (○-○) sistema completo más 1 mM de cloranfenicol.

Esto junto con que análogos del sustrato acceptor como la puromicina son activos en ausencia de etanol sugiere que el sitio A de la peptidiltransferasa es más accesible que el sitio P.

Los ribosomas 70S son más activos que sus subunidades 50S en la fijación de UACCA-Leu tanto a 33% como a 50% (v/v) de alcohol, ello posiblemente es debido a que la subunidad 30S estabiliza la fijación a 50S, ya que como se muestra en Tabla XIII, la fijación a 70 S reconstituídos a partir de 50S y un exceso de 30S alcanza un 80% de la fijación correspondiente a los 70S iniciales no disociados, sustrayendo los valores de fijación a 30S que se deben a contaminación con 50S. Para obtener esta reconstitución fué necesario una molaridad 8 veces mayor de 30S que de 50S, cosa que podría explicarse por una mayor labilidad de las subunidades 30S. También se sometió la mezcla a calentamiento de 50°C durante 10 min., ello aumentaba la reconstitución posiblemente debido al mismo efecto por el cual el calentamiento es necesario para la reconstitución de subunidades 30S y 50S a partir de sus proteínas y tRNA (Traut y Nomura, 1968).

Por otra parte, así como la interacción de UACCA-Leu con subunidades 50S es rápida, alcanzándose el equili-

brío en los diez primeros minutos de incubación (Fig. 15), la fijación a ribosomas 70 S es más lenta, requiriendo de 30 a 60 minutos para su complección.

TABLA XIII

FIJACION DE UACCA-Leu A RIBOSOMAS RECONSTITUIDOS

% Fijación de la radioactividad añadida

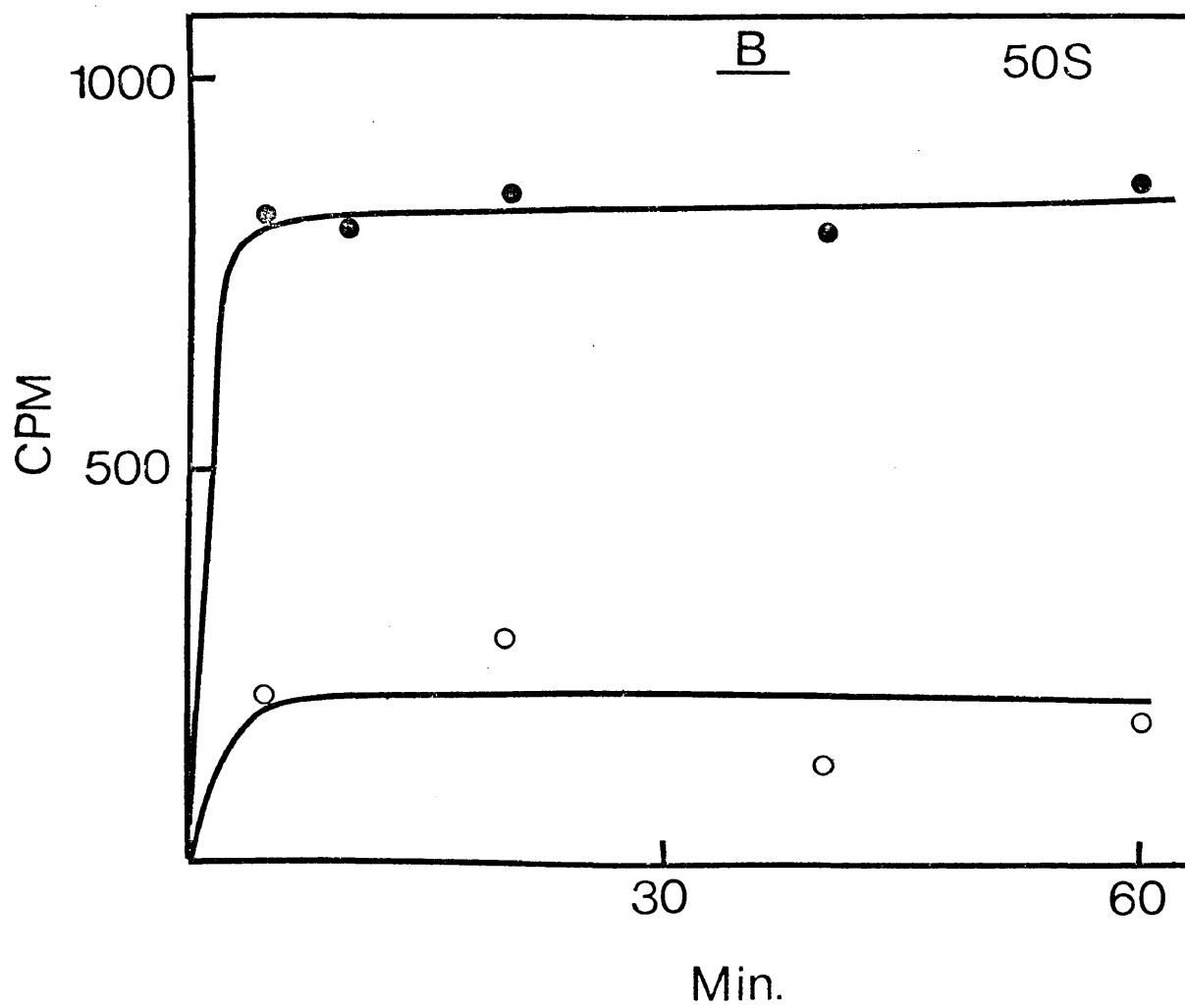
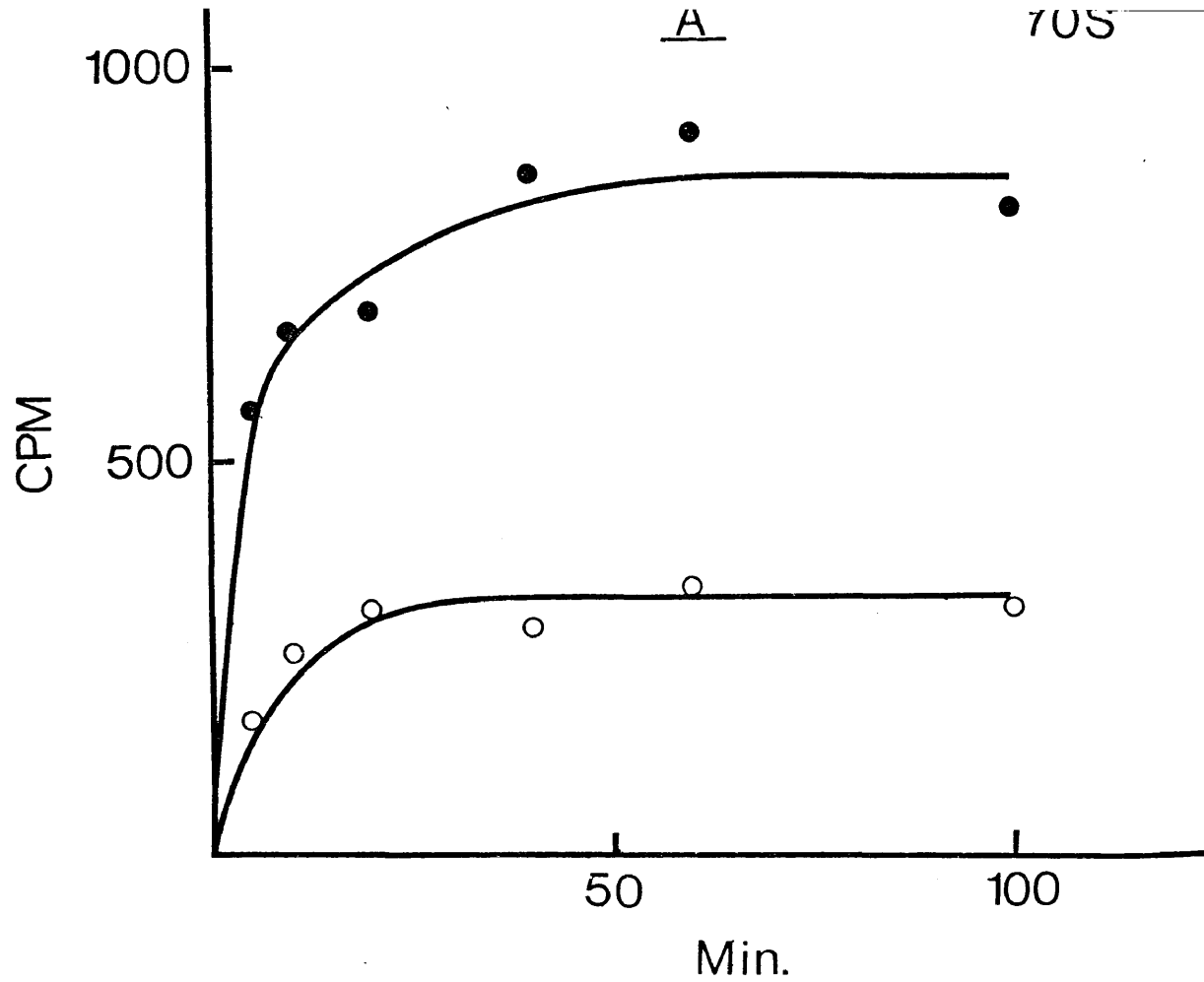
Ribosomas	Sin antibiótico	Con cloranfenicol 1 mM	Diferencia
70S	33	0	33
50S	7	7	0
30S	18	4	14
50S + 30S	46	7	39
-----			:

Se emplearon 1,5 mg/ml de ribosomas 70S, 1 mg/ml de subunidades 50S y 3,7 mg/ml de subunidades 30S. Los ribosomas fueron tratados como se indica en el texto. El tiempo de incubación fué de 60 minutos. El resto de condiciones y método de ensayo como se indica en la Fig. 14.

FIG. 15.- Fijación de UACCA-Leu a (A) ribosomas 70S ó
(B) subunidades 50S. Se emplearon 3 mg/ml
de 70S o de 50S y las muestras de incubación se tomaron
a los tiempos indicados. Otras condiciones experimenta-
les fueron como las indicadas en Fig. 12.

(●—●) Fijación de UACCA-Leu en el control;

(○—○) Fijación de UACCA-Leu en presencia de cloranfenicol.



a) Requerimiento iónico

En experimento I de la Tabla XIV se empleó la misma preparación de ribosomas que en las pruebas similares efectuadas con sustrato acetilado, siendo concentrados igualmente por ultracentrifugación. Como allí se veía la concentración final de Mg^{++} en la mezcla de incubación es de 3 mM. Se puede observar que en estas condiciones no existe fijación de UACCA-Leu a 50S, produciéndose por el contrario fijación a 70S. Si se disminuye la concentración de Mg por paso de los ribosomas a través de una columna de Sephadex G-50 fino como se hizo en el caso de CACCA-Leu-Ac todavía sigue produciéndose formación de complejo UACCA-Leu-70S.

Por estudio de perfil de sedimentación en gradiente de sacarosa y por medida del efecto hipercrómico producido por calentamiento, Ghysen, Bollen y Herzog (1970), demostraron que la estructura cuaternaria del ribosoma depende de la razón (R) entre cationes monovalentes y divalentes; de manera que a medida que R aumenta, los ribosomas van pasando de su forma más compacta a su disociación en subunidades, continuando por un progresivo aflojamiento seguido de desplegamiento de su estructura. Por tanto, en las condiciones en que la concentración

TABLA XIV

REQUERIMIENTO DE IONES Mg^{++} EN LA FIJACION DE UACCA-Leu A
RIBOSOMAS 70S y 50S.

% Fijación de la radioactividad añadida

	<u>Ribosomas</u>	<u>Incubación</u>	<u>Sin antibiótico</u>	<u>Con clor fenicol</u>
Exp. 1	50S	Sistema completo	43	11
		menos Mg	11	9
	70S	Sistema completo	78	37
		menos Mg	71	25
Exp. 2	70S	Sistema completo	52	20
		menos Mg	40	20

----- :

La mezcla de incubación y el método de ensayo se realizó co-
mo se indica en Tabla VIII, excepto que se empleó 2 nM de
UACCA-Leu y 1 mM de cloranfenicol donde se indica.

de Mg es muy baja como en el experimento descrito, el que
no se produzca fijación a las subunidades 50S puede supo-
nerse es debido a que pierden por desplegamiento la es-
tructura necesaria para la formación del complejo. Por
igual razón los 70S pierden la capacidad de fijar CACCA-

Leu-Ac en ausencia de Mg pero conservan por el contrario la capacidad de fijar UACCA-Leu. Esta fijación puede ser consecuencia de que también en estas condiciones las subunidades 30S estabilizan el complejo como en el caso de fijación en condiciones standard.

Como puede observarse en tabla XV la fijación de este sustrato tanto a ribosomas 70S como a 50S es dependiente del ión K^+ . Basándose en el hecho visto entre otros por Huxley y Zabay (1960) de que las subunidades 50S pueden agregarse al disminuir la relación de iones monovalentes a iones divalentes, bien con los 30S para dar 70S, bien con otra 50S probablemente por su zona de contacto para dar un dímero, postulamos que el sustrato no acetilado se fijaría en la zona de contacto de ambas subunidades, separadas en condiciones normales, por lo que no podría hacerlo en los 70S compactos que se formarían en ausencia de K^+ ni en los dímeros de 50S formados en las mismas condiciones.

Por otro lado, el sustrato acetilado, cuya fijación es igual en 70S que en 50S se fijaría en una zona próxima a la del no acetilado, que aunque no afectada por la agregación de la 30S podría serlo por la de otra 50S; de esta manera en ausencia de K^+ los 70S podrían fijar este sustrato, pero no los 50S agregados.

TABLA XV

REQUERIMIENTO DE IONES K^+ EN LA FIJACION DE UACCA-Leu A RIBOSOMAS 70S Y 50S.

<u>% Fijación de la radioactividad añadida</u>			
<u>Ribosomas</u>	<u>Incubación</u>	<u>Sin antibiótico</u>	<u>Con cloranfenicol</u>
50S	Sistema completo	27	8
	menos K^+	9	11
70S	Sistema completo	63	10
	menos K^+	8	11

La mezcla de incubación y el método de ensayo se realizó como se indica en Tabla IX, excepto que se empleó 2 nM UACCA-Leu y 1 mM de cloranfenicol donde se indica.

b) Reversibilidad del complejo

Si una vez fijado UACCA-Leu a ribosomas se aísla el complejo formado y se diluye mediante una serie de lavados con una mezcla de solución tampón-etanol de iguales características que la solución de incubación inicial, se produce a lo largo de los lavados (Fig. 16) un progresi-

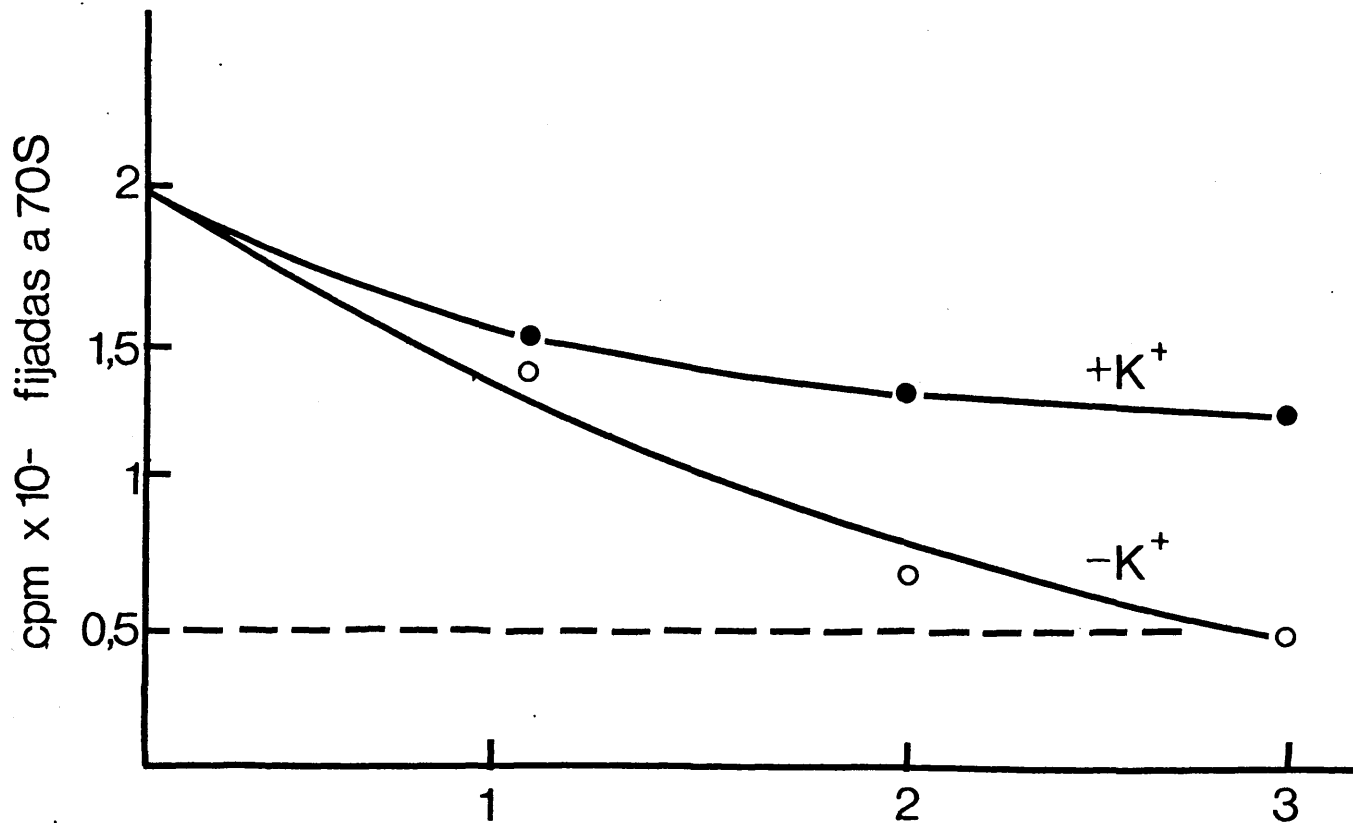


FIG. 16.- Estabilidad del complejo UACCA-Leu-ribosomas. La formación del complejo se efectuó en las condiciones indicadas en métodos, empleando 4 mg/ml del ribosomas 70S y 4200 cpm de UACCA(³H) Leu y 50 % (v/v) de etanol. Cada lavado se efectuó por con 0,3 ml de la misma solución de sales-etanol empleada en la incubación. Durante el tiempo de lavado se agitó la mezcla enérgicamente durante unos minutos en mezclador. A continuación se sedimentaron de nuevo los ribosomas a 5000 g durante 20 min. y se leyó la radioactividad desprendida en cada uno de los líquidos de lavado. Se representó con línea discontinua la fijación inicial en presencia de cloranfenicol. Líquido de lavado en presencia (●-●), o en ausencia (○-○) de iones K⁺.

vo desprendimiento de radioactividad. Así como la presencia o ausencia de K^+ en los líquidos de lavado no influye en la velocidad de desprendimiento de sustrato acetilado fijado a ribosomas, en este caso la eliminación de este ión aumenta la velocidad de disociación del complejo. Esto está de acuerdo con el hecho de que la fijación de UACCA-Leu es más fuertemente dependiente de la presencia de potasio que la fijación de sustrato acetilado (ver tabla IX y XV). Por otra parte, el que la fijación del sustrato en cuestión sea detectable por el método de filtración, con la dilución que ello supone (Tabla XVI) es indicativo de que la estabilidad del complejo así formado es mayor que el formado en presencia de CACCA-Leu-Ac.

Prueba concluyente de que la fijación de UACCA-Leu a 70S se trata de un equilibrio reversible, es que una vez formado el complejo (muestra 3) (Tabla XVII), se puede disociar por cloranfenicol (muestra 5), en igual extensión que si la fijación se hubiera efectuado en presencia de este antibiótico (muestra 4). Se hicieron controles para comprobar que la preincubación no inactiva el sistema (muestra I y 2).

TABLA XVI

FIJACION DE UACCA-Leu Y CACCA-Leu-Ac A RIBOSOMAS 70S.

MEDOTO DE FILTRACION.

<u>Sustrato</u>	<u>Adiciones</u>	<u>% Fijación de la radioactividad añadida</u>
UACCA-Leu	---	21
	Cloranfenicol 1 mM	5
CACCA-Leu-Ac	---	5
	Estreptogramina A 0,1 mM	5

=====

Se emplearon 3 mg/ml de ribosomas 70S. Siendo la mezcla de incubación realizado en las condiciones standard de fijación de ambos sustratos (Fig. 9 y Fig. 14), El tiempo de incubación fué de 30 minutos. El ensayo se efectuó por filtración como se indica en la sección de métodos.

TABLA XVII

REVERSIBILIDAD DEL COMPLEJO

	<u>Tiempo de incubación (mín.)</u>	<u>Adiciones a tiempo</u>	% Fijación de la radioactividad añadi
1	10	---	36
2	10	Cloranfenicol . mM a 0 min.	17
3	20	---	48
4	20	Cloranfenicol 1 mM a 0 min.	17
5	20	Cloranfenicol 1 mM a 10 min.	19

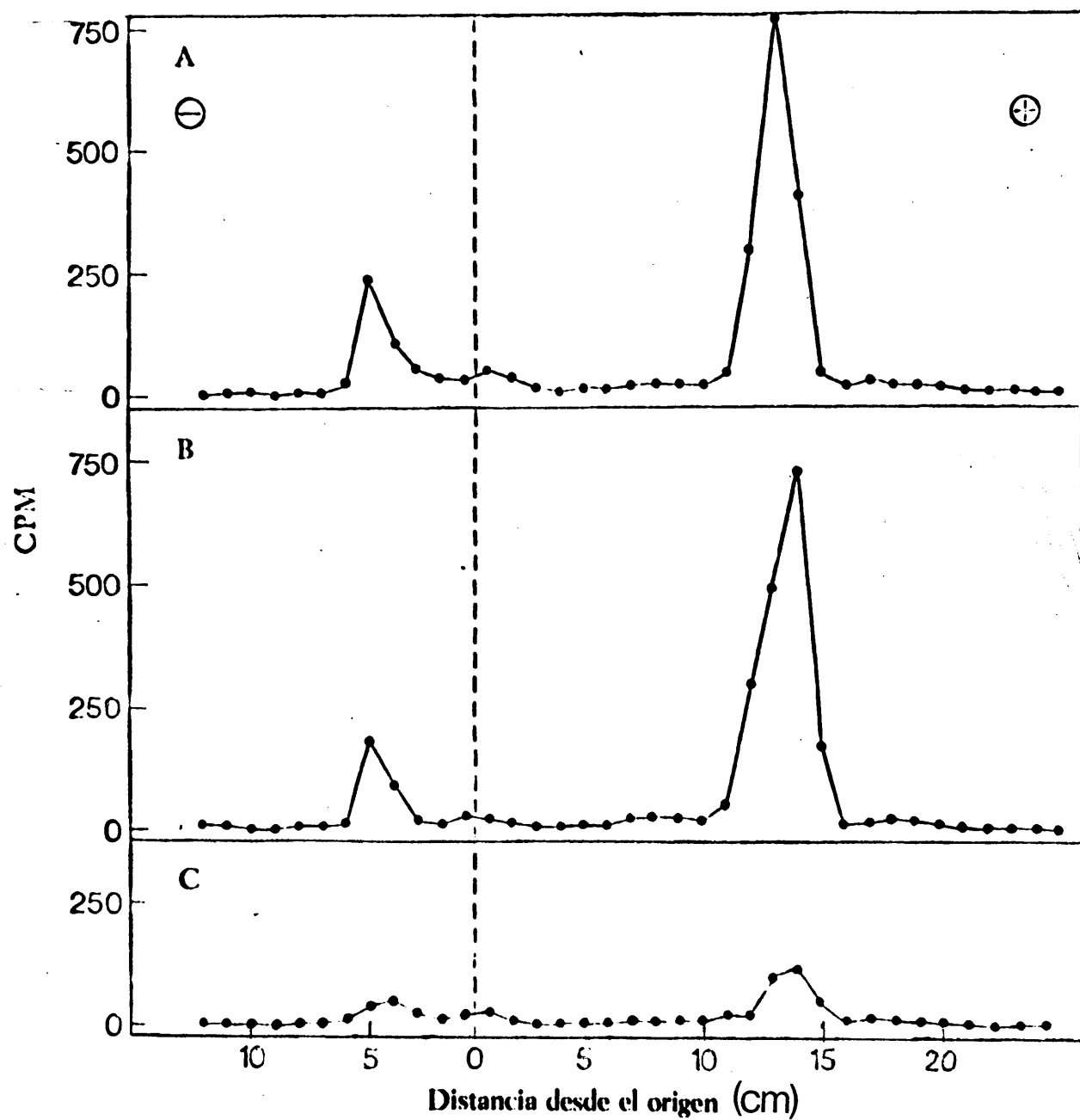
La concentración de ribosomas 70S empleados fué de 3,5 mg/ml. En la muestra 5 para evitar el factor de dilución se añadió la mezcla de incubación sobre un tubo conteniendo el cloranfenicol desecado.

c) Identificación del producto.

Una vez fijado el sustrato a las subunidades 50S en condiciones standard en presencia o ausencia de cloranfenicol se aisló el complejo por centrifugación y se disoció por resuspensión en 0,1 mM Mg. Después de separar los ribosomas por ultracentrifugación para evitar su posterior interferencia, se sometió el eluato a caracterización por electroforesis en papel a pH 6,5. Junto con las muestras problema se corrió en paralelo un control de UACCA (H^3)Leu sometido previamente a los tratamientos anteriormente descritos. La mayor parte de la radioactividad (85 - 90 %) del eluato del complejo formado en ausencia de CAP se movía (Fig. 17) como una única banda a la misma velocidad que el sustrato control. El eluato procedente del complejo formado en presencia de este antibiótico contenía los mismos componentes pero en cantidades más reducidas.

Para investigar si durante la fijación se produce la formación de UACCA-(Leu)₂ y dado que este compuesto hemos encontrado que se mueve a la misma velocidad que UACCA-Leu en las condiciones antes indicadas, una vez formado el complejo se sometió a hidrólisis alcalina, siendo los productos analizados por cromatografía usando Leu y

FIG. 17.- Ionograma (pH 6,5) de (A) marcador de UACCA(H^3)Leu; (B) elución del complejo de UACCA(H^3)Leu y subunidades 50S y (C) como "B" pero el complejo se formó en presencia de 1 mM de cloranfenicol. Las condiciones de incubación fueron como las de la Fig. 14, pero con 18 nM de UACCA-Leu y 5 mg/ml de subunidades 50S en un volumen de 0,150 ml. Después de 5 min de incubación a 0°C las muestras se centrifugaron 5 min a 35000 g y el sedimento se disolvió en 0,6 ml de $(Ac)_2O$, 0,1 ml. Los ribosomas se sedimentaron por centrifugación 5 horas a 150000 g. El sobrenadante se liofilizó, redisolvió en agua y se sometió a electroforesis en papel Watman nº 52 a pH 6,5 durante 50 min. a 110 v/cm. Se procedió a la estimación de radioactividad como se indica en métodos.

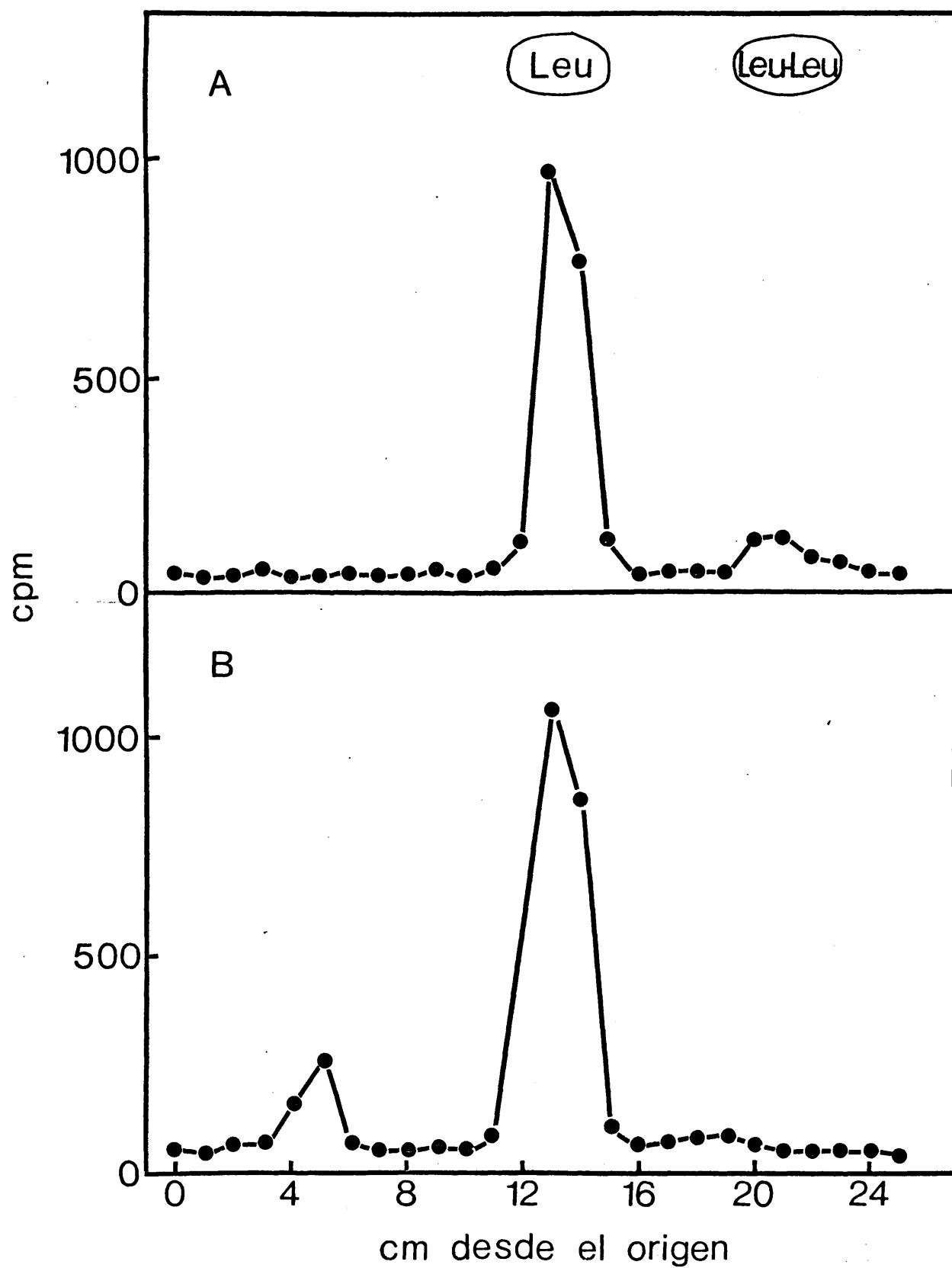


(Leu)₂ como marcadores standard según se especifica en métodos. El producto formado procedente del material fijado a los ribosomas corre (Fig. 18-A) a la misma velocidad que Leu; alrededor de un 10% de la radioactividad fijada se mueve como dileucina. La radioactividad no fijada a los ribosomas (panel B) se desplaza en su mayor parte (85 - 90 %) como Leu, no existiendo formación apreciable de (Leu)₂. El pico cercano al origen que aparece en "B", aunque no identificado, no se comporta por su movilidad como dileucina. Se puede concluir pues que el complejo consiste principalmente en UACCA-Leu fijado a ribosomas; no obstante, posiblemente por la existencia de entrada parcial del sustrato a sitio P, se produce en las condiciones utilizadas pequeña cantidad de dileucina, que quedaría retenida en su mayor parte en los ribosomas como UACCA-(Leu)₂.

Efecto de antibióticos sobre la fijación de CACCA-Leu-Ac y UACCA-Leu a subunidades 50S.

En un intento de relacionar el sitio de fijación de antibióticos al ribosoma con la inhibición que producen sobre la formación de enlace peptídico y dado que uno de los mecanismos por los cuales pueden actuar es el de su competición por el sitio de fijación de los sustratos de dicha reac-

FIG. 18.- Análisis cromatográfico de los productos formados en la reacción de fijación de $\text{UACCA}(\text{H}^3)\text{Leu}$ tras hidrólisis alcalina. El volumen de la mezcla de incubación fué cinco veces mayor que en los experimentos de fijación standard (Fig. 12) empleando 3 mg/ml de subunidades 50S y siendo el tiempo de incubación de 5 min. Se efectuó el ensayo como se indica en la sección de métodos. Panel (A) Cromatografía de los productos procedentes de material fijado a ribosomas. Panel B) Cromatografía de productos no fijados a ribosomas después de incubación. Los círculos indican las posiciones de los patrones de Leu y $(\text{Leu})_2$ no radioactivos.



ción, se ensayó el efecto de estos antibióticos sobre la fijación de CACCA-Leu-Ac y UACCA-Leu a subunidades 50S. En la tabla XVIII aparecen los resultados. La proporción de sustrato fijado en presencia de antibiótico está referida a la fijación efectuada en su ausencia, que se tomó como cien por cien. Cloranfenicol se ve tiene un efecto opuesto en la fijación de ambos sustratos, lo cual es fuerte evidencia de que éstos se fijan a sitios distintos. Este hecho sugiere que cloranfenicol inhibe la formación de enlace peptídico por competición con el sustrato aceptor en su extremo 3' terminal.

Esta competencia por el sustrato aceptor es indirectamente confirmada por los experimentos de competición en cinética de reacción de Nacetil-aminoacil-tRNA con puromicina en la que Goldberg (1967), encuentra inhibición de tipo mixto (Competitiva y no competitiva), mientras que para Pestka (1970), esta inhibición sería competitiva pura. Empleando el sistema más simplificado de reacción de CACCA-Leu-Ac con puromicina (Fernández-Muñoz, Tesis doctoral), se ha encontrado que cloranfenicol presenta inhibición mixta con relación al sustrato puromicina. Puede concluirse que hay al menos una interacción aunque sea parcial entre cloranfenicol y puromicina por el mismo sitio de fijación. Aparte de la inhibición de sustrato no acetilado, la estimulación que produce

TABLA XVIII

FIJACION DE UACCA-Leu Y CACCA-Leu-A SUBUNIDADES 50S:

EFEECTO DE ANTIBIOTICOS

<u>Antibiótico</u>	<u>Concentra- ción (mM)</u>	<u>UACCA-Leu % del control</u>	<u>CACCA-Leu-Ac % del control</u>
Cloranfenicol	1	0	126
Lincomicina	1	4	36
Estreptogramina A	0,1	11	8
Carbomicina	1	10	12
Espiramicina III	1	24	12
Oleandomicina	1	64	125
Eritromicina	1	106	156
Celesticetina	1	120	123
Viridogriseina	1	120	160
Edeina	0,002	100	115
Sulfato de polidextrano	0,005	100	100
Tetraciclina	0,1	110	150
Anisomicina	0,1	100	100

El ensayo en el caso de fijación de UACCA-Leu se efectuó con 5 mg/ml de subunidades 50S, 2 nM de sustrato, siendo la incubación de 5 min. En el caso de fijación de CACCA-Leu-Ac se efectuó con otra preparación de subunidades 50S en una concentración de 3 mg/ml, empleándose 2 nM de sustrato y 15 min. de incubación. Los antibióticos que contenían etanol eran previamente desecados en los tubos de la reacción. El resto de las condiciones y el método de ensayo se efectuó en las condiciones standard (Fig. 9 y Fig. 14).

cloranfenicol en la fijación de sustrato donador circunscribe al área de peptidiltransferasa el efecto similar observado por Goldberg en el N-acetil-aminoacil-tRNA, (Goldberg y col. 1969), pudiendo tener significación en el efecto de este antibiótico. Así pues, estos experimentos prueban la inhibición de fijación de la parte terminal de aminoacil-tRNA con el ribosoma por cloranfenicol, hecho que hasta la fecha no se había esclarecido, ya que este antibiótico no inhibe ni fijación enzimática (Yukioka y Morisawa, 1969) ni fijación no enzimática de aminoacil-tRNA al ribosoma (Vázquez y Monro, 1967), posiblemente debido a interacciones múltiples del tRNA con el ribosoma.

Lincomicina que inhibe fijación de cloranfenicol a ribosomas tiene el mismo efecto inhibidor sobre fijación del sustrato no acetilado, pero además inhibe también, aunque menos eficazmente, fijación de sustrato acetilado. Puede pues decirse, que este antibiótico inhibe formación de enlace peptídico por la inhibición de la fijación de ambos sustratos. Sin embargo celesticetina, análogo estructural de lincomicina, aunque inhibe formación de enlace peptídico, debe actuar de modo distinto a lincomicina, ya que estimula la fijación de ambos sustratos. Esto da prueba de la especificidad de acción de antibióticos muy relacionados químicamente.

Del grupo de estreptogramina, estreptogramina A, inhibidor de formación de enlace peptídico, inhibe prácticamente toda la fijación de los dos sustratos, mientras viridogriseína, representante muy activo del grupo de estreptogramina B, y que no es buen inhibidor de formación de enlace peptídico, ni de fijación total de estreptogramina A (Ennis 1971) produce estimulación en la fijación de los sustratos.

Hemos ensayado del grupo de macrólidos varios antibióticos. Podemos distinguir que los que son buenos inhibidores de formación de enlace peptídico (Capítulo I, Monro y Vázquez, 1967), carbomicina y espiramicina III son a su vez inhibidores potentes de fijación de los dos sustratos, mientras que eritromicina y oleandomicina, que no inhiben aquella reacción se comportan de modo distinto, así ambos estimulan la fijación de sustrato acetilado mientras que sólo oleandomicina inhibe parcialmente fijación del sustrato no acetilado. Esto muestra el heterogéneo comportamiento de los macrólidos aún con escasas diferencias estructurales como eritromicina y oleandomicina, lo cual dificulta el generalizar sobre su modo de acción en biosíntesis de proteínas como por ejemplo describen Mao y Robishaw (1971).

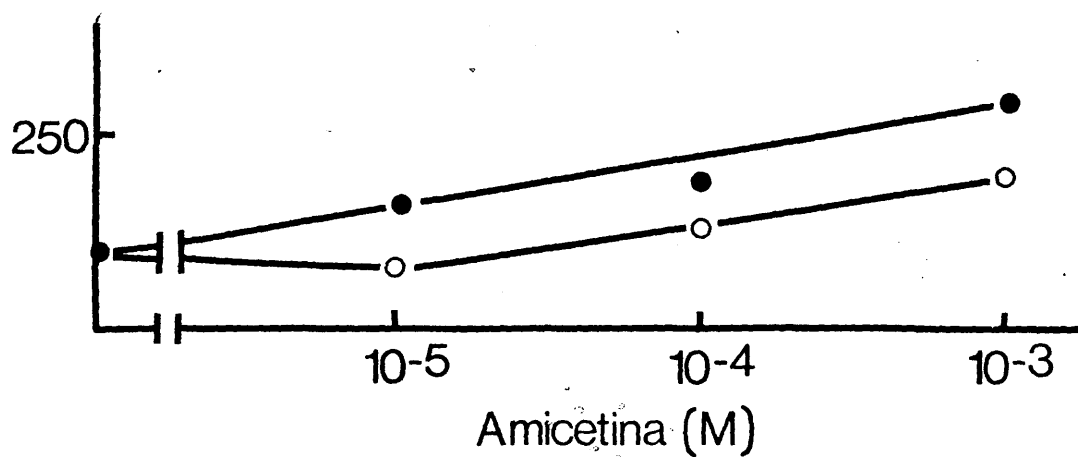
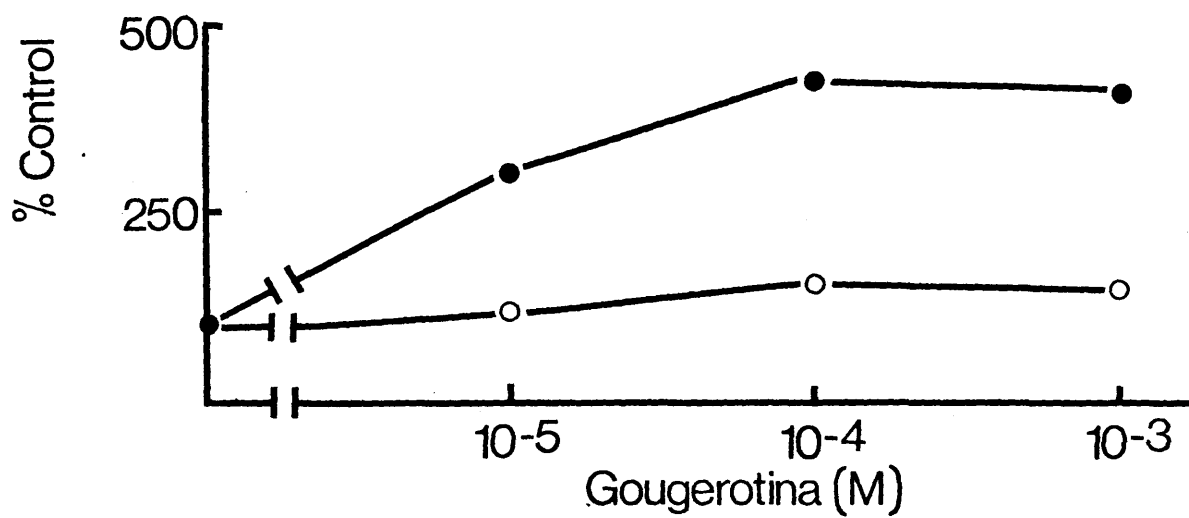
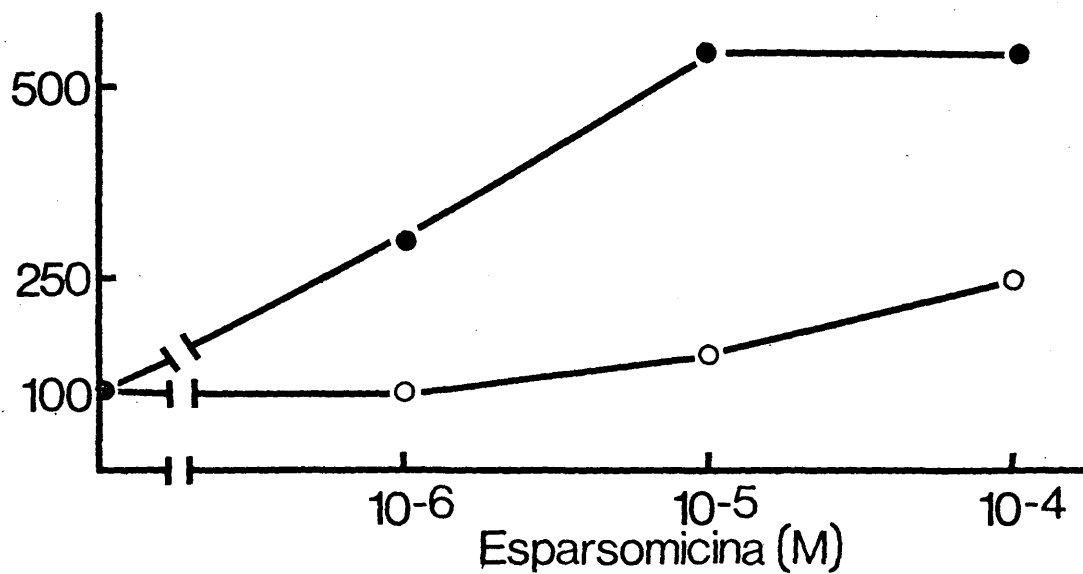
La fijación de sustratos no es afectada por edeina, sulfato de polidextrano o anisomicina. La respuesta de estos an-

tibióticos da idea de la especificidad del sistema con el que se ha trabajado, ya que edeina y sulfato de polidextrano bloquean síntesis de proteínas por inhibir la función de subunidad 30S (Kurylo-Borowska y Hierroski, (1965), Vázquez y Monro (1967), Munro (1965), mientras que anisomicina actúa específicamente sobre ribosomas de tipo eucariótico (Neth y col., 1970).

Tetraciclina antibiótico de acción preferencial sobre la fijación de aatRNA no inhibe fijación de nuestros sustratos, lo que confirma que su acción no está localizada sobre el centro enzimático peptidiltransferasa de la subunidad 50S.

El grupo de antibióticos derivados de pirimidina, esparsomicina, gougerotina y amicetina, estimulan preferencialmente la fijación del sustrato acetilado como puede observarse en Fig. 19. El que esparsomicina estimule la fijación del sustrato no acetilado posiblemente es debido a la parcial entrada de éste en el sitio donador del ribosoma como se discutirá en la siguiente sección, ya que Ravel y col., (1970), encuentran que este antibiótico inhibe fijación enzimática de aminoacil-tRNA. En el capítulo siguiente dedicado a esparsomicina, se estudiará detenidamente el posible mecanismo de acción de este antibiótico.

FIG. 19.- Efecto de esparsomicina, gougerotina y amice-
tina sobre la fijación de CACCA(H^3)Leu-Ac y
UACCA(H^3)Leu. Las mezclas de incubación fueron como las
indicadas en Fig. 7, excepto que se utilizó 1 mg/ml de
subunidades 50S, siendo el tiempo de incubación de 5 min.
El ensayo se efectuó como se indica en la sección de mé-
todos. Sistema (●-●) en presencia de CACCA-Leu-Ac; (○-○)
en presencia de UACCA-Leu.



Resultados similares a los anteriormente expuestos se obtuvieron cuando se emplearon partículas 70S en lugar de 50S, así como cuando UACCA-Leu fué sustituido por CACCA-Leu, lo que muestra la generalidad del efecto de estos antibióticos.

Tipos de fijación de UACCA-Leu a ribosomas.

Con objeto de conocer la naturaleza, homogeneidad y número de sitios de fijación de UACCA-Leu a las subunidades 50S, realizamos experimentos a distintas concentraciones de sustrato para trazar la curva de saturación, representando los resultados según la gráfica de Scatchard, (Scatchard, 1949), como se ve en Fig. 20.

Siendo $\frac{\bar{v}}{(F)} = K_F n - K_F \bar{v}$, donde \bar{v} es el número de moléculas de UACCA-Leu unidas por ribosomas; (F) es la concentración de UACCA-Leu libre; n es el número de sitios por ribosomas y K_F es la constante de asociación para UACCA-Leu. Una representación de tipo Scatchard con \bar{v} en abcisas y $\bar{v}/(F)$ en ordenadas es lineal con una intersección sobre el eje \bar{v} y una pendiente de $-K_F$. Si hay más de una clase de sitios de fijación, la representación será no lineal.

Puede observarse en Fig. 20 que existen dos tipos de fijación de afinidades dadas por constantes de asociación,

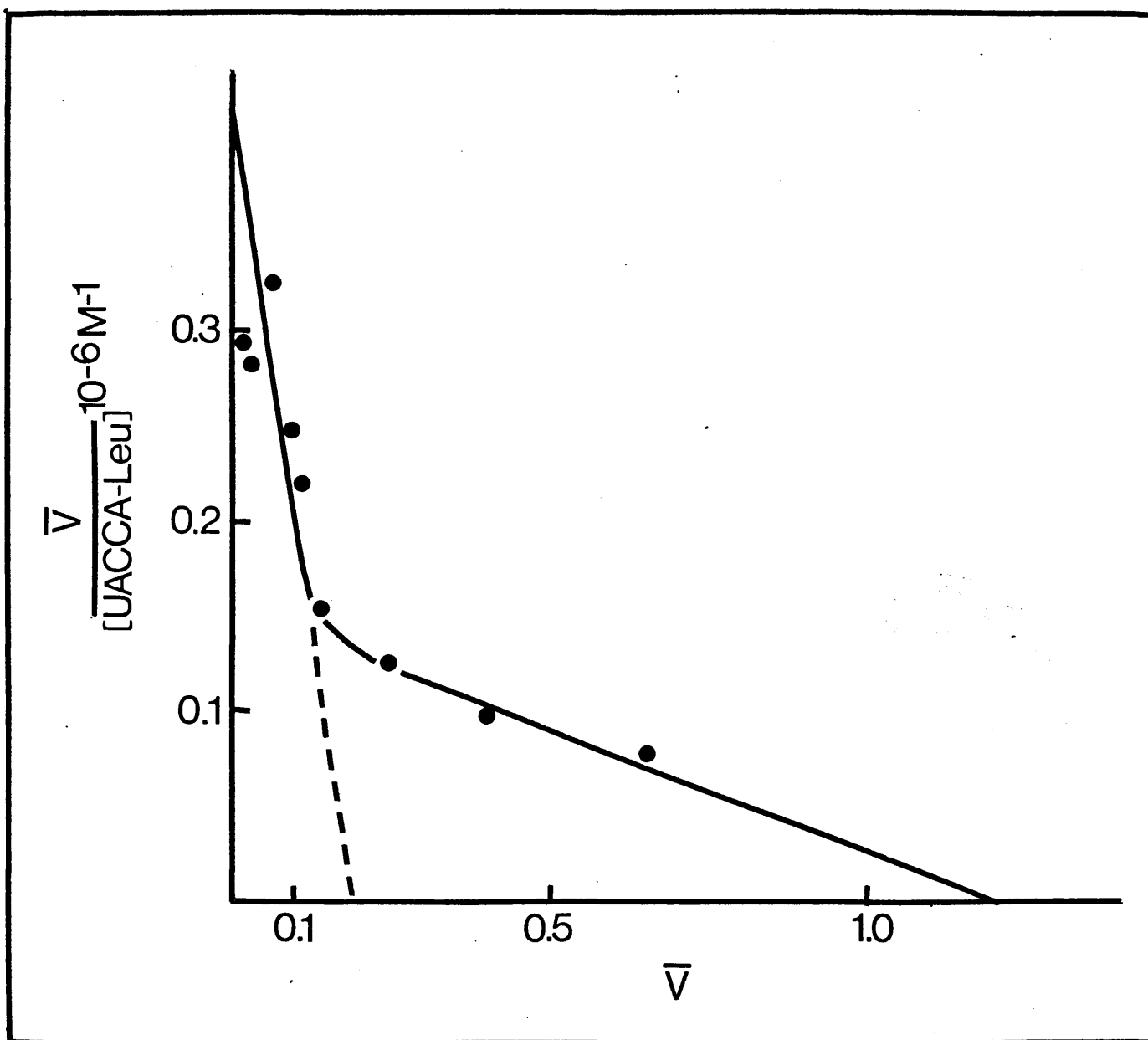


FIG. 20.- Representación de Scatchard para fijación de UACCA(C^{14}) Leu a subunidades 50S. La mezcla de incubación contenía en un volumen de 0,024 ml: 3 mg/ml de subunidades 50S ($1,8 \times 10^{-6} M$), concentración de sales standard, 50 % (v/v) de etanol y UACCA(C^{14}) Leu desde $9 \times 10^{-8} M$ a $9,6 \times 10^{-6} M$. El ensayo se efectuó como se indica en métodos.

una diez veces mayor que la otra. También se deduce de la misma que la fijación menos afín para UACCA-Leu pueden realizarla todos los 50S, mientras que sólo el 20 % de los mismos pueden simultáneamente fijarlo con la afinidad mayor. Con las concentraciones de sustrato y ribosomas empleadas en los ensayos de fijación realizados a lo largo de este trabajo, hemos estado midiendo una fijación que casi en su totalidad corresponde al tipo de mayor afinidad, aunque hay una pequeña proporción del otro tipo de fijación. Al poder haber dos tipos de fijación simultáneamente sobre el ribosoma es claro que existen dos sitios distintos donde puede unirse UACCA-Leu correspondientes a ambas afinidades. Dado que cloranfenicol inhibe casi totalmente la fijación más fuerte, es decir la medida en experimentos standard de fijación y dado que este antibiótico no inhibe fijación de CACCA-Leu-Ac, sustrato que va al sitio donador, queda excluido que esta mayor afinidad corresponda a dicho sitio. Del hecho que haya formación, aunque en pequeña proporción de dileucina en las condiciones de fijación empleadas, se deduce que ha sido necesario el que UACCA-Leu en parte haya ido al sitio aceptor, es decir sitio A del ribosoma. Por ello hay fuerte evidencia de que este sitio de mayor afinidad por nosotros detectado sea el propio sitio A.

Ya que UACCA-Leu es capaz de formar dileucina, así como reaccionar, aunque con mucha menor velocidad con puromicina (Fig. 21) que CACCA-Leu-Ac, debe de fijarse en parte al sitio donador. Posiblemente esta fijación es la correspondiente a la de baja afinidad de la gráfica de Scatchard. Esto justifica la gran diferencia en la cinética de reacción de UACCA-Leu con puromicina comparada con la del sustrato acetilado que debe de fijarse con mucha mayor afinidad al sitio P del ribosoma.

Así pues, dando por prueba que el sustrato acetilado se fija en la proporción de una molécula por partícula 50S (Capítulo III), concluimos que el sustrato acetilado se fija sólo al sitio donador al cual se fija aunque con mucha menos afinidad el sustrato no acetilado, según se deduce de la cinética de su reacción con puromicina, y que UACCA-Leu se une preferencialmente al sitio A del ribosoma.

Esta distinción entre el sitio de fijación de sustrato acetilado y no acetilado viene contrarrestada por los siguientes hechos probados en este trabajo:

- 1.- Distinto requerimiento iónico (Mg^{++} y K^{+}) para la fijación de ambos sustratos.
- 2.- Diferente comportamiento en su unión a ribosomas 70S y subunidades 50S, dado por: medidas de cinética de

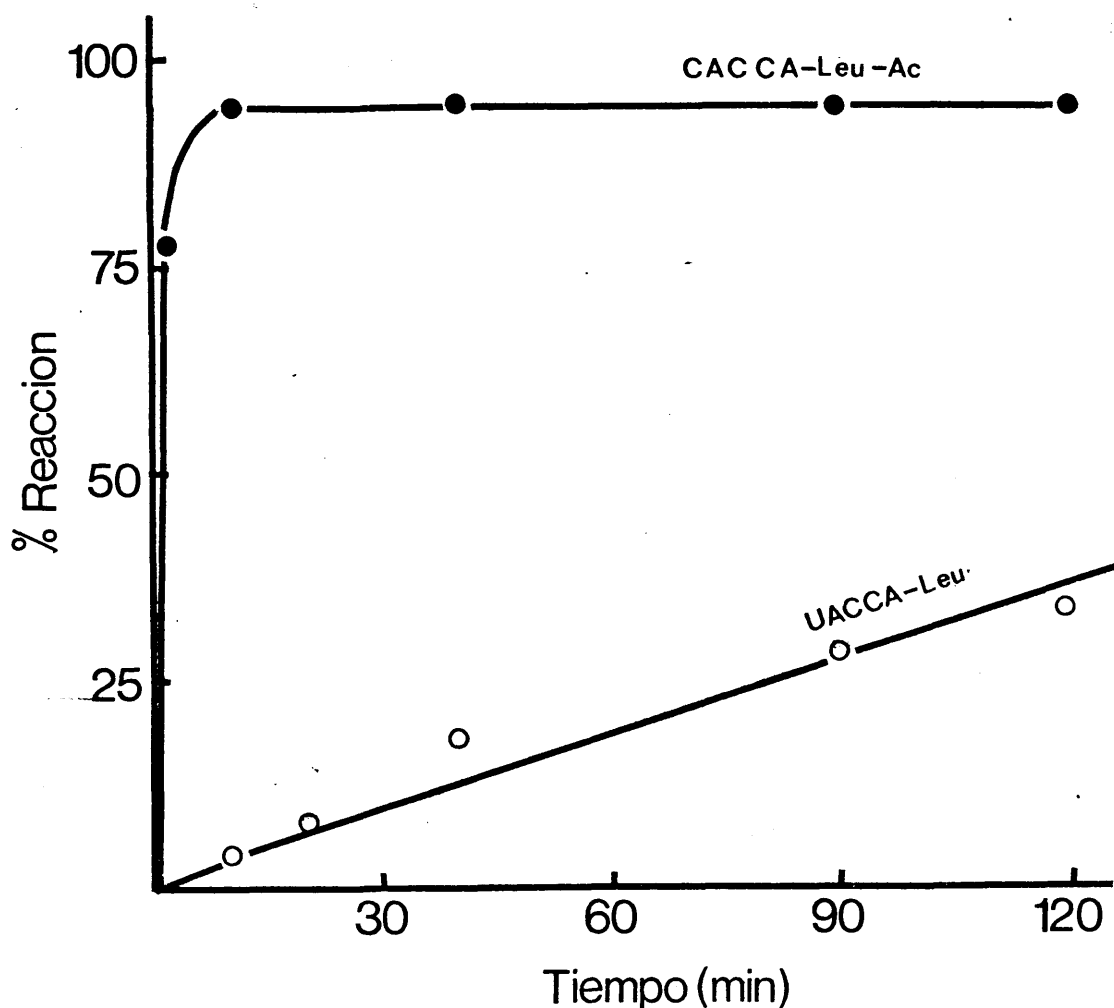


FIG. 21.- Cinética de reacción de CACCA-Leu-Ac y UACCA-Leu con puromicina. La mezcla de incubación en un volumen de 0,075 ml contenía: 6 mg/ml de subunidades 50S, 2 mM de puromicina, 2 nM de sustrato CACCA-Leu-Ac o UACCA-Leu, 50 % (v/v) de etanol y concentración salina standard. El método de ensayo por extracción con acetato de etilo se indica en métodos. Se comprobó la eficiencia de extracción de Leu-PM por sucesivas extracciones con acetato de etilo, siendo el material reaccionable extraído en la primera superior al 80 %. A los valores dados les fueron sustraídos los blancos a cada tiempo en ausencia de antibiótico.

fijación; efecto estimulante de las subunidades 30S en fijación a 50S sólo para sustrato no acetilado y menor dependencia respecto a etanol en la fijación de este sustrato a ribosomas 70S.

- 3.- Distinto comportamiento frente a la acción de algunos antibióticos que actúan en el centro enzimático peptidiltransferasa. Así cloranfenicol mientras estimula la fijación de sustrato acetilado, inhibe la de sustrato no acetilado.

CAPITULO III.

MECANISMO DE ACCION DE ESPARSOMICINA SOBRE EL CENTRO PEPTIDILTRANSFERASA DEL RIBOSOMA.

Esparsomicina es un activo inhibidor de biosíntesis de proteínas tanto en sistemas de organismos procarióticos como de organismos eucarióticos. Ejerce su acción a nivel del ribosoma bloqueando la formación de enlace peptídico. Como vimos en Cap. I, inhibe la formación de Acetilil-leucil-puromicina utilizando como sustrato tanto Ac-Leu-tRNA, como el N-acetil-leucil-oligonucleótido derivado de este tRNA. Con objeto de conocer más detalles sobre el mecanismo por el cual actúa esparsomicina sobre el ribosoma, se procedió al estudio detallado de la interacción de ribosomas y CACCA-Leu-Ac en presencia de este antibiótico.

Formación del complejo CACCA-Leu-Ac-ribosoma inducido por esparsomicina.

A lo largo de los experimentos que presentaremos en este capítulo, se demuestra que esparsomicina produce la estimulación de la fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas de E. Coli. En los ensayos descritos a continuación, se utilizaron (excepto en los casos específicos que se indicarán), las condiciones de ensayo empleadas en la reacción del frag-

mento (1 mg/ml de ribosomas y 33 % (v/v) de etanol) pero en ausencia de puromicina. En estas condiciones al ser muy pequeña la fijación de sustrato (Fig.22), la estimulación debida a la esparsomicina se hace más significativa, alcanzando valores que oscilaban, según la preparación de ribosomas, entre 60 y 80% de la radioactividad añadida. Como puede verse en la figura indicada, se ensayó el efecto de la concentración de ribosomas sobre la formación del complejo CACCA-Leu-Ac ribosomas; la fijación es máxima para una concentración de ribosomas de 1 mg/ml a una concentración constante de sustrato.

La fijación de Ac-Leu-T₁ depende de la concentración de esparsomicina presente (Fig. 23), siendo máxima a valores de 0,1 mM.

En la tabla XIX se muestra que en el sistema completo con ribosomas 70S y CACCA-Leu-Ac, 0,1 mM de esparsomicina estimula la fijación a ribosomas hasta asociarse con los mismos del 60 al 70% de la radioactividad añadida. Resultados similares se obtienen sustituyendo los ribosomas 70S por sus subunidades 50S, mientras que no hay estimulación por esparsomicina cuando se sustituyen los ribosomas por subunidades 30S. Por tanto, el efecto de esparsomicina es ejercido a nivel de la subunidad mayor, no siendo necesaria la presencia simultánea de la otra subunidad para su actuación, lo que circunscribe el lugar de acción de la esparsomicina a la subunidad 50S y concretamente al área de la peptidiltrasferasa.

FIG. 22.- Fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas en presencia de esparsomicina: efecto concentración de ribosomas. La mezcla de incubación contenía en un volumen de 0,1 ml los siguientes componentes: CACCA(H^3)Leu-Ac (7 nM; actividad específica aproximada 18 Ci/mmol), esparsomicina 0,1 mM (Ac)₂Mg 20 mM, CLK 400 mM, Tris-ClH pH 7,5, 50 mM y ribosomas 70S en la concentración indicada. Se equilibró la mezcla a 0°C y se inició la reacción por adición de 0,05 ml de etanol frío. El tiempo de incubación fué de 20 min. El ensayo de fijación por centrifugación se efectuó como se indica en métodos.

(●-●) sistema completo; (○-○) sistema completo en ausencia de esparsomicina; (▲-▲) esparsomicina sustituida por 0,1 mM estreptogramina A.

FIG. 23.- Fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas en presencia de esparsomicina: efecto concentración de esparsomicina. Mezcla y tiempo de incubación como en Fig. 22, empleando 1 mg/ml de ribosomas 70S. El ensayo se efectuó por centrifugación como se indica en métodos.

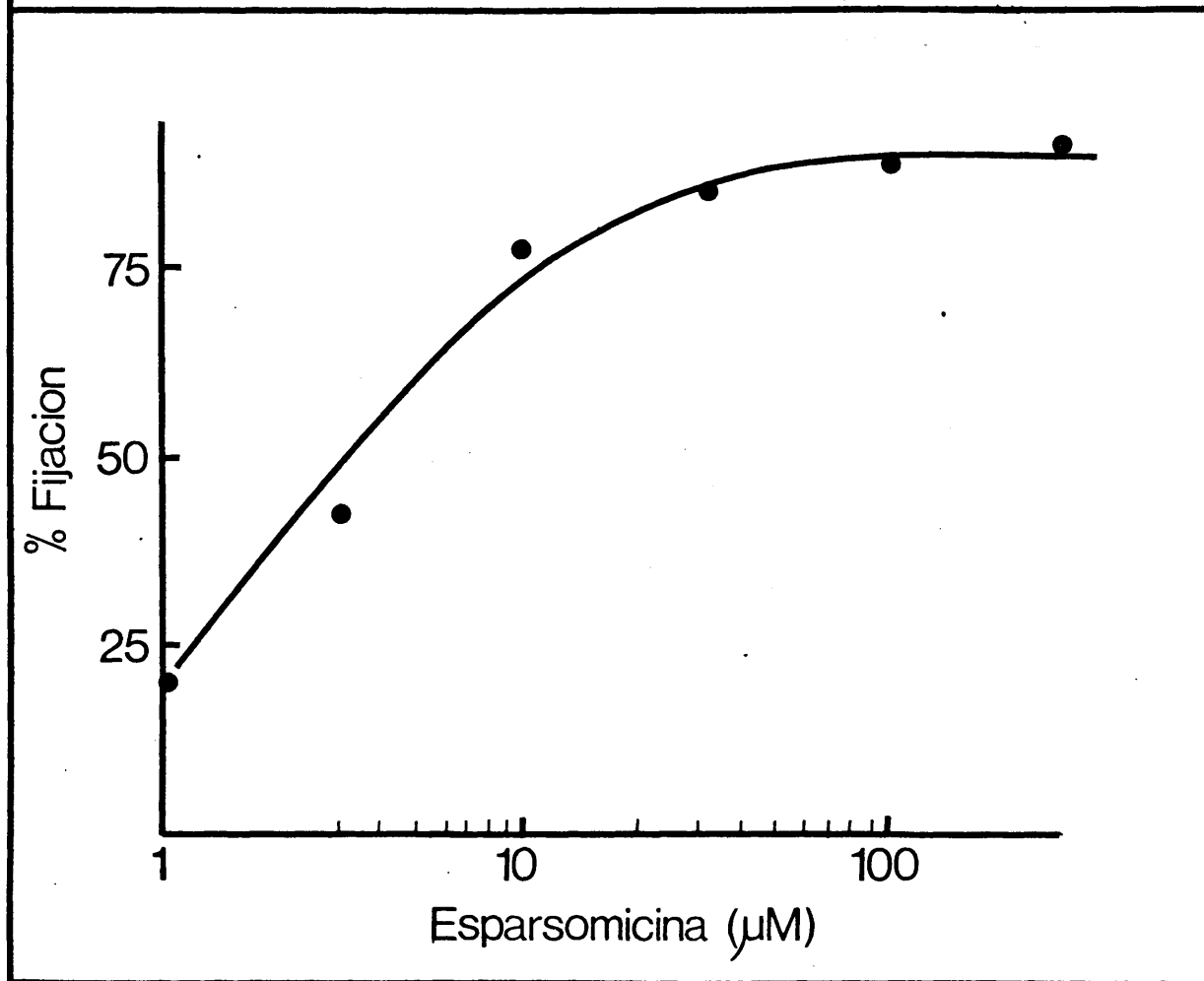
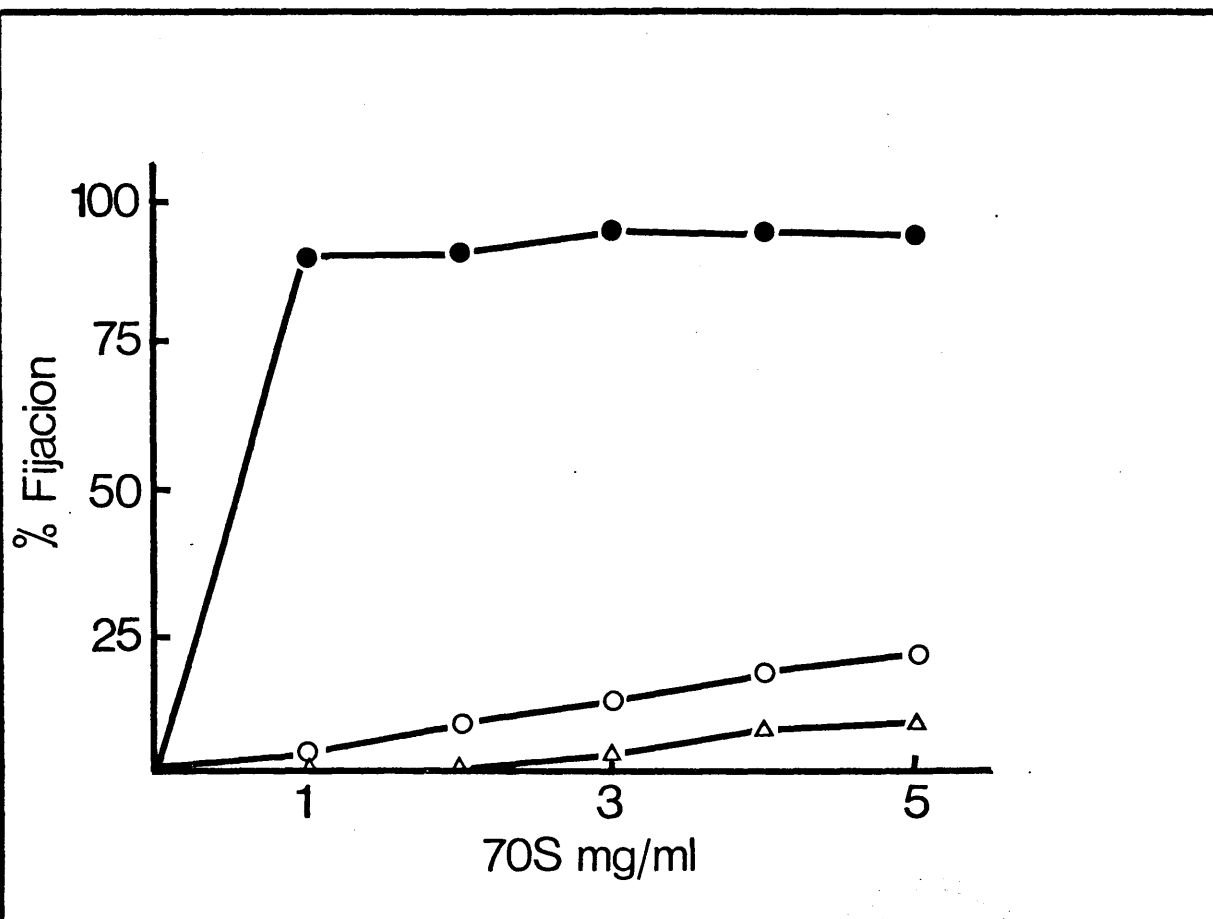


TABLA XIX

REQUERIMIENTOS PARA LA FORMACION DEL COMPLEJO CACCA-Leu-Ac-
RIBOSOMA DEPENDIENTE DE ESPARSOMICINA.

Exp. 1 (CACCA-H ³ -Leu-Ac)	Fijación dependiente de esparso- micina (%)
Sistema standard	64
70S sustituidos por subunidades 50S	63
70S sustituidos por subunidades 30S	6
Sin K ⁺	0
Sin K ⁺ , 50S en lugar de 70S	3
Exp. 2 (CACCA-H ³ -Leu-Ac)	
Sistema standard	70
0,1 mM Mg ⁺⁺	0
Sin etanol	2
Etanol sustituido por metanol	56
Exp. 3 (Variación de sustrato)	
CACCA-(H ³)-Leu-Ac	63
UACCA (H ³)-Leu-Ac	64
ACCA-(H ³)-Leu-Ac	49
CCA-(H ³)-Leu-Ac	47
CACCA (S ³⁵) Met-F	33
(P ³²)-CCA	0

La mezcla de incubación standard contenía (antes de la adición de alcohol) en un volumen de 0,1 ml los siguientes com-

ponentes: 1 mg/ml de ribosomas 7CS, CACCA (H^3) Leu-Ac (7 mM, actividad específica aproximada 18 Ci/mmol); esparsomicina 0,1 mM; acetato magnésico 20 mM, CLK 400 mM, Tris-ClH, pH 7,5, 50 mM. Se añadieron u omitieron componentes según se indica. Las muestras se equilibraron a 0°C y se inició la reacción por adición de 0,05 ml de etanol frío. Después de incubación durante 20 minutos se procedió a la estimación de radioactividad fijada como se indica en métodos en la sección de fijación de sustratos por centrifugación.

Controles en los que se omitió esparsomicina dieron de 0 a 12% de fijación, variando con diferentes preparaciones y condiciones. En cada tratamiento se efectuaron controles, siendo sustraídos de los valores de fijación efectuada en presencia de esparsomicina para el cálculo de la "fijación dependiente de esparsomicina".

En las condiciones de experimento "2" los ribosomas no precipitan por lo que el ensayo fué modificado de la manera siguiente: la mezcla de incubación fué centrifugada 180 min. a 150.000 g, estimándose la radioactividad en el sobrenadante.

La actividad específica de CACCA (S^{35}) Met-F era aproximadamente de 500 m Ci/mmol y la de (P^{32}) CCA aunque desconocida era probablemente mayor de 1 Ci/mmol.

Los iones K^+ y Mg^{++} , al igual que el etanol, son requeridos para que tenga lugar esta fijación. El etanol puede sustituirse por metanol, alcohol que como se ha visto es también estimulante de la actividad peptidiltransferasa. En sistemas carentes de etanol, la esparsomicina inhibe activamente la formación de enlace peptídico (Goldberg y Mitsugi, 1967a). Por tanto la presencia de alcohol es tan sólo necesaria para promover, como hemos visto en el capítulo anterior, la interacción sustrato-ribosoma. No ha sido posible el caracterizar la fijación de esparsomicina

a ribosoma por no haber podido disponer de este antibiótico marcado isotópicamente, pero es probable que los iones antes indicados sean necesarios para su fijación.

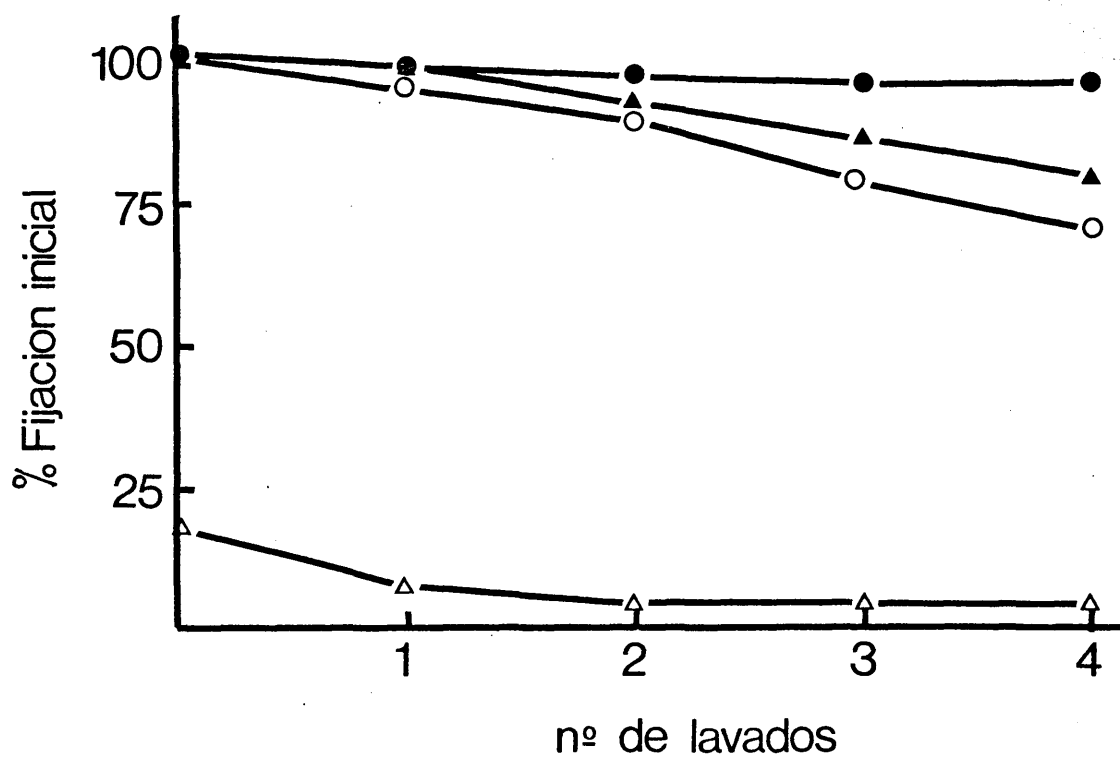
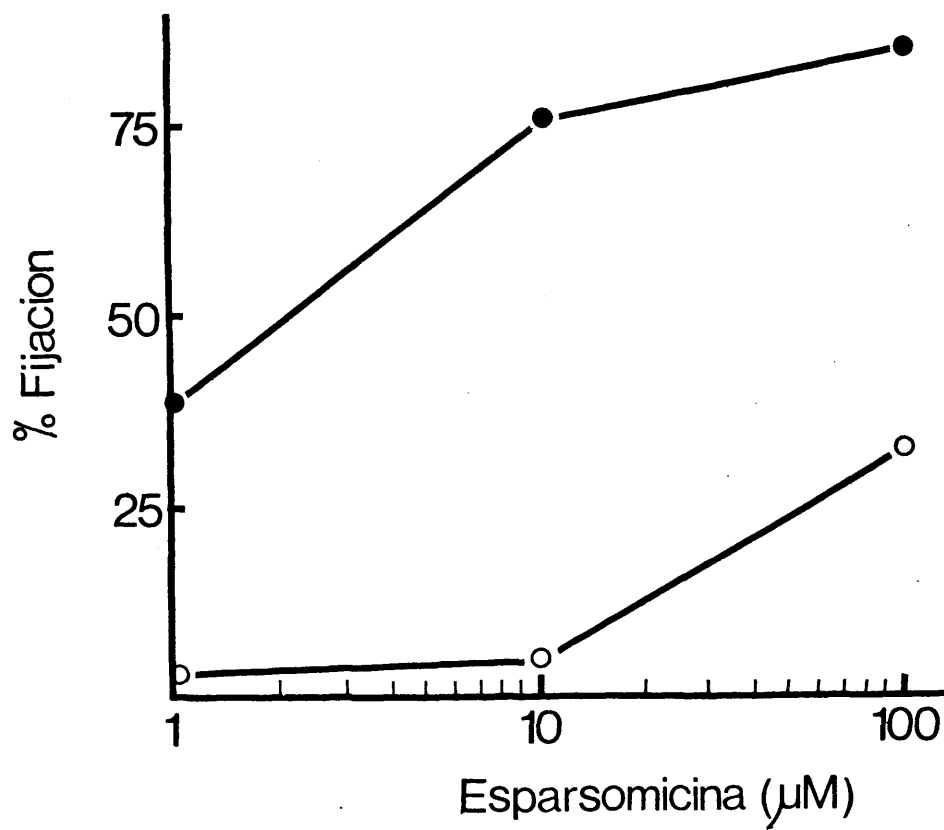
Como se aprecia en la Tabla XIX la esparsomicina estimula la fijación a ribosomas de CACCA-Leu-Ac, UACCA-Leu-Ac, ACCA-Leu-Ac y CCA-Leu-Ac, nucleótidos terminales resultantes de la digestión de Ac-Leu-tRNA con ribonucleasa T_1 . Esto es, el sustrato puede ser tan pequeño como CCA-Leu-Ac parte común a todos los tRNA de E. Coli conocidos e imprescindible para su reacción con PM (Monro, Cerná y Marcker, 1968). También es activo el oligonucleótido terminal de formil-metionil-tRNA. En estas condiciones la fijación del oligonucleótido no acetilado, CACCA-Leu- es a su vez estimulada, aunque en menor proporción que el acilado, siendo nula a concentraciones más bajas de esparsomicina (Fig. 24). Por ello, esparsomicina estimularía la fijación de los sustratos que se fijarán en el sitio donador, preferencialmente con el grupo NH_2 en α sustituido, caso de peptidil-tRNA.

Si se emplea como sustrato el oligonucleótido CCA, carente por tanto del grupo N-aminoacil terminal, la fijación no tiene lugar, por lo que parece ser obligatoria su presencia en nuestras condiciones para la formación del complejo, con lo cual se excluye la posibilidad de que esparsomicina interfiera en síntesis de proteínas impidiendo la

FIG. 24.- Efecto de la concentración de esparsomicina sobre la fijación de CACCA-Leu-Ac y UACCA-Leu- a ribosomas 70S. La composición de la mezcla y el tiempo de incubación fué como se indica en Fig. 22. Concentración de ribosomas 70S fué de 1 mg/ml. El ensayo de fijación por centrifugación se efectuó como se indica en métodos (●-●) con CACCA-Leu-Ac (o-o) con UACCA-Leu.

FIG. 25.- Estabilidad del complejo.- Se hicieron cuatro incubaciones por duplicado para la formación de complejo CACCA-Leu-Ac-ribosomas. Estas se efectuaron en condiciones standard, conteniendo en un volumen de 0,100 ml: 5 mg/ml de ribosomas 70S, 8000 cpm de CACCA-Leu-Ac (actividad específica aproximada 18 C/mmol), 0,1 mM esparsomicina ó 0,1 mM estreptogramina A, concentración salina standards. Se inició la incubación por adición de 0,05 ml de etanol. Se aislaron los complejos por centrifugación 20 min a 5000 g y 4°C y se sometió cada muestra al número de lavados que se indica. Los lavados se efectuaron diluyendo con 0,3 ml de una mezcla de sales-etanol a igual concentración que la reacción inicial y con las adiciones indicadas. La resuspensión se efectuó agitando enérgicamente durante 1 ó 2 min en mezclador. Se separaron los ribosomas por centrifugación, estimándose la radioactividad retenida por éstos por lectura de la radioactividad desprendida en el sobrenadante.

- (●-●) Incubación y líquido de lavado en presencia de 0,1 mM esparsomicina.
- (▲-▲) Incubación en presencia de 0,1 mM esparsomicina; líquido de lavado sin esparsomicina.
- (○-○) Incubación en presencia de 0,1 mM esparsomicina; líquido de lavado con 0,1 mM estreptogramina A.
- (Δ-Δ) Incubación y líquido de lavado con 0,1 mM estreptogramina A.



salida de tRNA deacilado una vez se ha producido la transferencia de la cadena peptídica.

Estabilidad del complejo.

Si CACCA-Leu-Ac unido a ribosomas en presencia de esparsomicina es diluido mediante lavados con solución tampón conteniendo este antibiótico (Fig. 25), la fijación del sustrato no disminuye apreciablemente a lo largo de la serie de lavados, lo que indica la gran estabilidad del complejo formado. Si los lavados se efectúan en ausencia de esparsomicina hay una ligera reversión del complejo como era de esperar, de un equilibrio prácticamente desplazado hacia la asociación. Sustituyendo la esparsomicina por estreptogramina A en los líquidos de lavado, la reversión, aunque pequeña, es ligeramente mayor. Estreptogramina A como se puede observar, en Tabla XX, inhibe la acción de esparsomicina sobre la fijación del sustrato cuando ambos antibióticos son añadidos a la mezcla de incubación simultáneamente y antes de iniciada la reacción. Si por el contrario, la adición de estreptogramina A tiene lugar una vez formado el complejo, este antibiótico es incapaz de revertir la fijación efectuada, prueba de la gran estabilidad del complejo formado en presencia de esparsomicina. El hecho

mismo de que esparsomicina produzca la estimulación de fijación del sustrato, hace pensar que la acción puede ser ejercida por una estabilización de la fijación o por la exposición, en su presencia, de nuevos sitios de fijación al ribosoma. Ya que como veremos en este capítulo con ribosomas totalmente activos en presencia de esparsomicina, se fija una molécula de sustrato por ribosoma a concentración saturante de sustrato, la última posibilidad mencionada queda descartada.

TABLA XX

ESTABILIDAD DEL COMPLEJO FRENTE A ESTREPTOGRAMINA A.

<u>Tiempo de incubación</u> (min.)	<u>Adiciones</u>	<u>% Fijación</u>
5	---	78
5	Estreptogramina A de 0'a 5'	16
10	Estreptogramina A de 5'a 10'	77

Mezcla de incubación como en Tabla XIX, Concentración final de estreptogramina 0,1 mM. El ensayo se efectuó como se indica en métodos.

Por otra parte el ión K^+ aunque necesario para la formación del complejo, no lo es para mantener su estabilidad (Tabla XXI); por el contrario la presencia de 0,1 mM Mg^{++} , suficiente para conservar la integridad de los ribosomas, no parece serlo para estabilizar dicho complejo. En el experimento comentado una vez formado el complejo, se aisló y resuspendió, siendo necesario etanol (línea 6) para evitar la desintegración del mismo. El que la ausencia de etanol produzca este efecto, indica que la interacción ribosoma-sustrato no ha tenido lugar a través de enlaces covalentes como se confirma con la identificación del producto de esta fijación efectuada en este mismo capítulo.

En las condiciones standard empleadas, como se muestra en Tabla XXII, la estabilidad del complejo no es dependiente de la presencia de 30S, ya que tanto los ribosomas como sus subunidades 50S producen complejos estables frente a lavados efectuados en presencia y ausencia de potasio.

Naturaleza del complejo

Como hemos indicado anteriormente, la fijación de sustrato a ribosomas en presencia de esparsomicina, aunque muy estable puede ser revertida resuspendiendo el sedimento de ribosomas en solución tampón en ausencia de etanol.

TABLA XXI

ESTABILIDAD DEL COMPLEJO EN AUSENCIA DE ESPARSOMICINA, IONES Y ETANOL.

<u>Líquido de dilución</u>	<u>Radioactividad retenida por ribosomas (% del control)</u>
1 2 standard	77
2 2 más 0,1 mM esparsomicina	90
3 menos K^+	90
4 0,1 mM Mg^{++}	37
5 0,1 mM Mg^{++} , menos K^+	36
6 menos etanol	6

Se efectuaron mezclas de incubación de 0,150 ml en las mismas condiciones que las utilizadas en Tabla XIX. Aislado el complejo por centrifugación 15 min. a 3.000 g y 4°C. Se resuspendió en 0,5 ml de la solución empleada en fijación o con las modificaciones indicadas. Se separaron de nuevo los ribosomas por centrifugación durante 20 min. a 5.000 g. (muestras 1-3) o durante 180 min. a 150.000 g (muestras 4-6), estimándose radioactividad retenida en los ribosomas por la lectura de la desprendida en el sobrenadante. Se tomó como control la fijación existente en los ribosomas antes de efectuar la dilución.

TABLA XXII

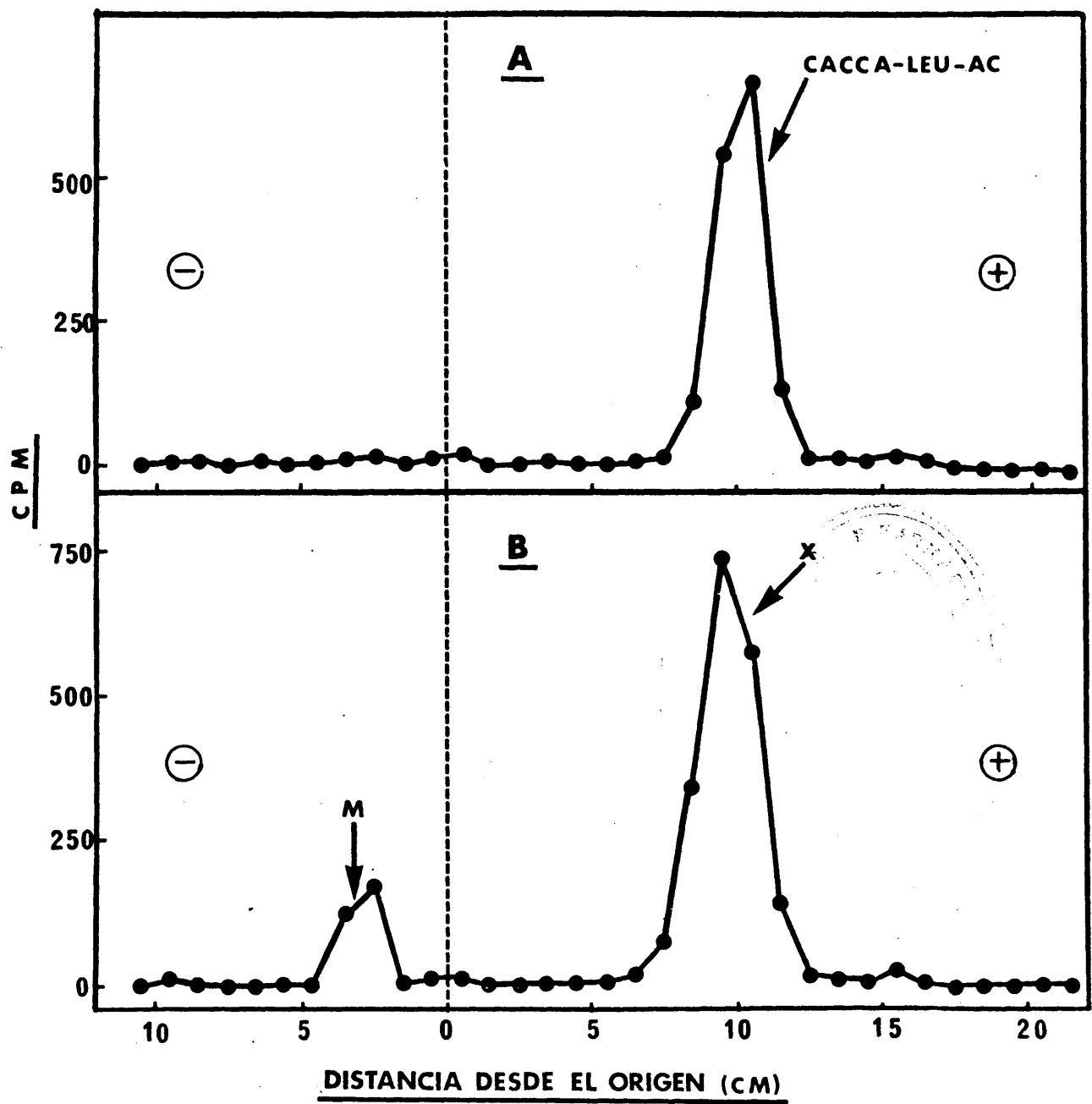
ESTABILIDAD COMPARADA DE COMPLEJOS FORMADOS CON RIBOSOMAS
70S Y CON SUBUNIDADES 70S.

Radioactividad unida al ribosoma % de control			
<u>Ribosomas</u>	<u>Líquido de lavado</u>	<u>1^{er} lavado</u>	<u>2º lavado</u>
70S	Solución standard	92	85
70S	(Menos K ⁺)	96	95
50S	Solución standard	97	84
50S	Menos K ⁺	95	91

Se efectuaron mezclas de incubación en condiciones de fijación standard (Tabla XIX). Se aislaron los complejos formados por centrifugación durante 15 min. a 5000 g. y 4°C y se sometió cada muestra a dos lavados por resuspensión del precipitado en 0,3 ml de solución empleada en fijación. Se agitó enérgicamente durante 1 ó 2 min. en mezclador y se sedimentaron de nuevo los ribosomas por centrifugación análoga a la anterior. Se estimó radioactividad fijada a ribosomas después de cada lavado por medida de la radioactividad desprendida en sobrenadante.

Para identificar el material eluido se formó el complejo CACCA(H^3) Leu-Ac con ribosomas, se aisló, desintegró y el eluido se caracterizó por electroforesis en papel. La Fig. 26 muestra que a pH 6,5 aproximadamente el 87% de la radioactividad "X" se mueve a la misma velocidad que el marcador de CACCA-Leu-Ac. El mismo resultado se obtuvo cuando se efectuó la electroforesis a pH 3,5. Cuando CACCA-Leu-Ac fué sustituido por UACCA-Leu-Ac, el otro oligonucleótido terminal resultante de la digestión de Ac-Leu-tRNA con ribonucleasa T_1 , el producto se desplazó a la misma velocidad que el marcador de UACCA-Leu-Ac (dos veces más rápido que CACCA-Leu-Ac como se indicó en métodos). Tanto a pH 6,5 como a pH 3,5 aparece en la proporción de un 13% un componente "M" no identificado cargado positivamente en ambos casos. Este producto podría ser de degradación, tal como Ac-Leu-adenosina o un producto secundario de la acción de esparsonicina. De este experimento se puede concluir que la reversión del complejo formado en presencia de esparsonicina produce la liberación del sustrato inicial no modificado, es decir que la interacción entre sustrato y subunidad 50S no implica enlaces covalentes con la molécula de sustrato, ya que en caso de que se hubieran producido la desintegración del complejo formado requeriría métodos más drásticos y la movilidad electroforética del sustrato queda-

FIG. 26.- Ionograma (pH 6,5) de (A) marcador de CACCA(H^3)-Leu-Ac y (B) elución procedente del complejo inducido por esparsomicina de CACCA-Leu-Ac y ribosomas. Condiciones de incubación como en la Tabla XIX, pero con 20 nM CACCA-Leu-Ac y 1 mg/ml de subunidades 50S. El ensayo fué efectuado como se indica en métodos. La electroforesis fué en papel Whatman nº 52, siendo sometido a 100 v/cm durante 1 hora.



ría modificada.

Incapacidad del complejo de reaccionar con puromicina.

A la vista de los resultados obtenidos con estreptogramina A y con objeto de averiguar si esparsomicina inhibe reacción de puromicina y por consecuencia síntesis proteica por formación de un complejo sustrato-ribosoma, que impida la reacción con el sustrato aceptor, se efectuó el experimento de Tabla XXIII. En dicho experimento se incubaron dos series de muestras en paralelo, con las adiciones indicadas; en la primera fué ensayada la fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas, mientras que en la segunda fué ensayada la formación de Ac-Leu-puromicina por el método de extracción, con acetato de etilo. Con objeto de hacer comparable la lectura de radioactividad en ambos sistemas, se aplicó un factor de corrección de eficiencia de conteo, resultante de la lectura de radioactividad de muestras standard de $H_2O(H^3)$ y tolueno (H^3) en los líquidos de centelleo de ambos ensayos.

Como se puede observar la incubación de CACCA-Leu-Ac con ribosomas en presencia únicamente de puromicina, conduce a la formación de Ac-Leu-puromicina, mientras que en la incubación con esparsomicina se produce la formación del complejo. En la línea 3 se ve que el complejo inducido por

TABLA XXIII

INCAPACIDAD DEL COMPLEJO PARA REACCIONAR CON PUROMICINA

	Tiempo de incubación (min.)	Adiciones		% Fijación	% Reacción de PM
		0-30 min.	30-60 min.		
1	30	PM	---	0	75
2	30	Espar	---	93	1
3	60	Espar	PM	91	1
4	60	PM	Espar	26	70
5	60	Sin adiciones	Espar	90	2
6	60	Sin adiciones	PM	0	76
7	30	Esp + PM	---	74	12

Condiciones de incubación como en la Tabla XIX , excepto que la concentración de esparsomicina (Espar) fué de 0,01 mM y de puromicina (PM) de 1 mM. Ensayo se efectuó como se indica en texto.

esparsomicina una vez formado no es desintegrado por puromicina ni capaz de reaccionar con este antibiótico para dar Ac-Leu-puromicina. Preincubación con puromicina (línea 4) conduce a la formación de Ac-Leu-puromicina, bajando la formación del complejo inducido por esparsomicina la cantidad equivalente a la

reacción de CACCA-Leu-Ac con puromicina. Controles de las líneas 5 y 6 muestran que los efectos de preincubación no fueron debidos a inactivación del sistema. Cuando puromicina y esparsomicina fueron añadidos simultáneamente a tiempo 0 min. (línea 7), parte del sustrato reacciona con esparsomicina y parte con puromicina para dar lugar respectivamente a complejo unido a ribosomas y Ac-Leu-puromicina. Las cantidades relativas de ambos productos dependían como se vió en otros experimentos, de las concentraciones y de los tiempos relativos a los que se añadían dichos antibióticos.

Con objeto de confirmar que la incapacidad de puromicina de romper el complejo 70S-ribosomas-esparsomicina no es debido a que esparsomicina produzca la fijación de Ac-Leu-puromicina a ribosoma, se efectuó el experimento de fijación de la Tabla XXIV. En él se incubó CACCA-Leu-Ac en presencia de puromicina en las condiciones de reacción del fragmento un tiempo suficientemente largo para que tuviera lugar la completa formación de Ac-Leu-puromicina; en dichas condiciones como se puede observar en línea 1, la fijación del sustrato a ribosomas es nula. Si entonces se añade esparsomicina el tiempo suficiente para que pueda actuar la fijación de radioactividad al ribosoma, sigue siendo nula, lo

TABLA XXIV

INCAPACIDAD DE Ac-Leu-PUROMICINA DE FIJARSE A RIBOSOMA EN PRESENCIA DE ESPARSOMICINA.

		Adiciones		% Fijación
Tiempo de incubación, (mín.)		0-120 min.	120-150 min.	
1	120	PM	---	0
2	150	PM	Espar	1
3	150	--	Espar	82

Condiciones de incubación como en Tabla XIX. Concentración de puromicina (PM) y esparsomicina (Espar) fué de 1 mM y 0,01 mM respectivamente.

que indica que una vez formado el producto Ac-Leu-puromicina, esparsomicina es incapaz de fijarlo al ribosoma. En línea 3 del experimento, aparece el control que indica no existe inactivación del sistema durante el tiempo de preincubación, produciendo esparsomicina en el segundo periodo de incubación, la fijación del sustrato esperada.

Estos resultados prueban:a) que el complejo inducido por esparsomicina no es reactivo con puromicina, y que una vez formado es irreversible en las condiciones empleadas, confirmando los resultados obtenidos con estreptogramina A;

b) que el producto de la reacción con puromicina, no puede fijarse a ribosomas en presencia de esparsomicina y c) que cuando se encuentran presentes esparsomicina y puromicina al mismo tiempo, hay una competición entre ambos en el centro activo peptidiltransferasa.

La falta de reactividad del complejo formado responde al tipo de inhibición competitiva pura entre esparsomicina y puromicina en la reacción de Ac-fenilalanil-tRNA con puromicina (Goldberg, 1967 y Pestka, 1970). Tanto nuestras experiencias como la de estos autores, no definen si el sitio de fijación de esparsomicina es el mismo que el de puromicina. Por otra parte el que esparsomicina inhiba fijación enzimática de aa-tRNA (Ravel y col., 1970) y que esparsomicina inhiba fijación de puromicina (Fernández-Muñoz, tesis doctoral) indica que esparsomicina solapa con el sitio A.

En cualquier caso nuestros experimentos concluyen que esparsomicina forma un complejo muy estable con el sustrato donador y el ribosoma que no es dissociable por el sustrato aceptor puromicina. El que concentraciones crecientes de puromicina reviertan el efecto inhibitor de esparsomicina (Goldberg, 1967 y Pestka, 1970), no se debe pues a disociación de aquel complejo, sino a que impide su formación al sustraer el sustrato donador por reacción con el mismo.

Efecto de antibióticos sobre la formación del complejo.

La Tabla XXV recoge el efecto de antibióticos inhibidores de síntesis de proteínas sobre la formación ribosoma-sustrato-esparsomicina. Se incubaron cada uno de estos antibióticos simultáneamente con la mezcla de reacción que contenía los componentes standard más una concentración de esparsomicina de 0,01 mM (sin añadir etanol), concentración a la cual al no estar saturado el sistema (ver Fig. 23) con esparsomicina, la sensibilidad frente a otros antibióticos es máxima. De esta manera la formación del complejo es inhibida por espiramicina III, carbomicina, estreptogramina A y lincomicina, antibióticos que bloquean reacción del fragmento con puromicina y, que como se vió en el capítulo anterior, inhiben la fijación de sustrato acetilado y no acetilado a ribosoma; parecen tener pues, a pesar de su heterogénea estructura, sitios de fijación a ribosoma interrelacionados con el centro catalítico peptidiltransferasa. Por otra parte cloranfenicol, celesticetina, viridogriseina, amicetina y gougerotina, inhiben también este complejo. Dado que esta serie de antibióticos no inhibe fijación del sustrato acetilado, lo inmediato es pensar que interfieren cada uno de ellos con la fijación de esparsomicina a la subunidad ribosómica 50S. Gougerotina y amicetina en ausencia de esparsomicina estimulan la fijación del sustrato acetila-

TABLA XXV

EFFECTO DE ANTIBIOTICOS SOBRE LA FORMACION DEL COMPLEJO.

<u>Antibiótico</u>	<u>Concentración (mM)</u>	<u>Fijación estimulada por esparsomicina (% del control)</u>
Cloranfenicol	1	3
Lincomicina	1	5
Celesticetina	1	74
Carbomicina	0,1	0
Espiramicina III	0,1	0
Estreptogramina A	0,1	2
Estreptogramina B	0,1	107
Viridogriseina	0,1	60
Eritromicina	0,1	117
Tetraciclina	0,1	97
Edeina	0,001	64 :
Chalcomicina	1	108
Amicetina	1	27
Gougerotina	1	42

Condiciones de ensayo como se indica en Tabla XIX, excepto que la concentración de esparsomicina antes de añadir el etanol fué de 0,01 mM. La fijación debida a esparsomicina fué del 70 % en el control sin antibiótico.

do; es posible pues, que estos antibióticos inhiban la reacción de esparsomicina más de lo que se apreciaba en Tabla XXV, pero que en su presencia se formen nuevos complejos. Es posible que estos antibióticos derivados de pirimidina, no inhibidores de la fijación de cloranfenicol a ribosomas y activos en ribosomas 70S y 80S, tengan un modo de acción relacionado con el de esparsomicina y que compitan por el mismo sitio de fijación, pero que los complejos inertes - formados en su presencia sean menos estables. Sin embargo, es posible haya diferencias de acción entre ellos, ya que amicetina, pero no esparsomicina ni gougerotina estimulan la fijación no enzimática de aatRNA al ribosoma dirigida por mensajero (Vázquez, y Monro, 1967). A su vez en la fijación enzimática de aatRNA esparsomicina produce inhibición (Ravel y col., 1970), mientras que gougerotina produce clara estimulación (Yukioka, Motisawa, 1969).

Cloranfenicol bloquea formación de enlace peptídico inhibiendo la fijación del oligonucleótido terminal de Leu-tRNA. Aunque no se ha visto que esparsomicina inhiba por completo la fijación de cloranfenicol en E. Coli (Fernández-Muñoz, Tesis doctoral), parece ser que los sitios de fijación de estos antibióticos está muy próximos, quedando afectada la fijación de esparsomicina al ribosoma en presencia de cloranfenicol.

Antibióticos como estreptogramina B, eritromicina, chalcemicina y tetraciclina no afectaron la formación del complejo, lo que es indicación de que la fijación de estos antibióticos no interfiere con la de esparsomicina.

Estequiometría de la fijación de CACCA-Leu-Ac en presencia de esparsomicina.

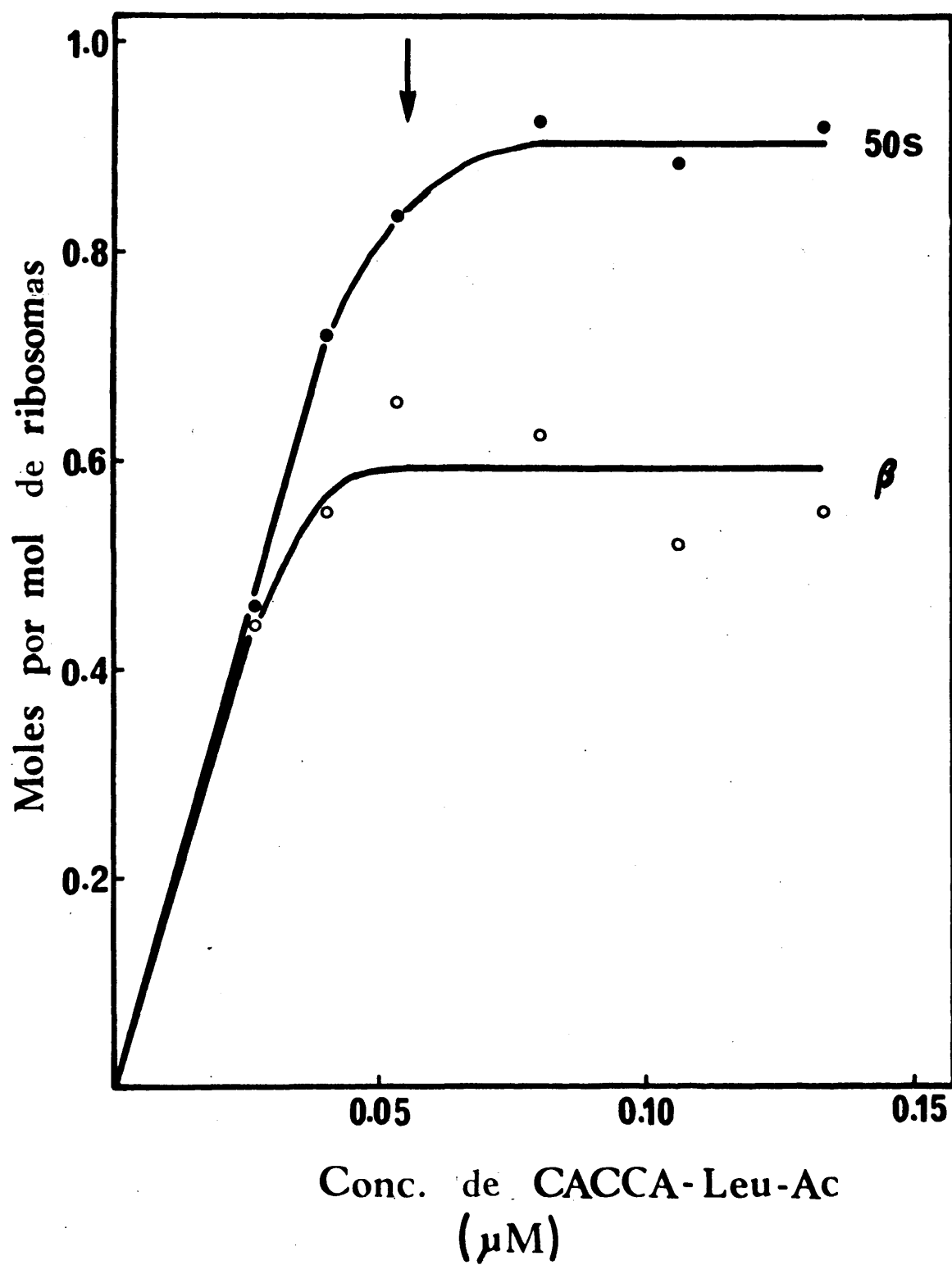
Con objeto de averiguar la estequiometría del complejo 50S-sustrato-acetilado formado en presencia de esparsomicina, se procedió a saturar el sistema de fijación con CACCA-Leu (H^3)-Ac. En las condiciones standard y debido a la dificultad de obtención de sustrato en grandes cantidades, se operó como hemos visto a concentraciones de ribosomas, (5×10^{-7} M), superiores a las de sustrato ($7-9 \times 10^{-9}$ M). En este tipo de ensayo con el fin de no hacer excesivo gasto de sustrato, era pues esencial reducir la concentración de ribosomas empleada. Para ello se desarrolló el método de filtración por adsorción a filtros de nitrato de celulosa descrito en la sección de métodos.

Otra condición a tener en cuenta para estimar con precisión las moléculas de sustrato fijado a ribosomas, era el disponer de una preparación de CACCA-(H^3)-Leu-Ac de actividad específica precisa. Aunque durante la carga de tRNA con leucina el extracto S_{150} utilizado carecía teóricamente

de aminoácidos por haber sido sometido a diálisis, no quedaba con este método excluida la posibilidad de que enzimas proteolíticas existentes en dicho extracto durante la incubación de carga, produjeran la liberación de pequeñas cantidades de aminoácidos, originándose así la variación de la actividad específica de CACCA-Leu(H^3)-Ac por derivados de dichos aminoácidos. Para evitar esta fuente de error se procedió a la carga de tRNA con L-leucina 4,5-T usando no la mezcla de todas las sintetetasas presentes en el sobrenadante S_{100} , sino una leucil-sintetasa pura que nos fué donada por P. Rouget y F. Chapeville, procediéndose después de la carga a la acetilación, digestión y aislamiento como se indica en métodos.

En estas condiciones y como se ve en la Fig. 27, el máximo de fijación en presencia de esparsomicina tiene lugar cuando se ha unido una molécula de sustrato de ribosoma. Como se muestra en la Fig. 28 a concentración saturante de sustrato en las dos horas utilizadas en el ensayo de la Fig. 27, el sistema se encuentra ya en equilibrio. El 90 % de las partículas 50S empleadas en estos ensayos son activas en síntesis de polipéptido. Esta estimación fué efectuada por T. Staehelin (1969) en cuyo laboratorio se efectuaron estos experimentos de estequiometría, mediante análisis en gradiente de sacarosa de la distribución -

FIG. 27.- Formación de complejo inducido por esparsomicina entre CACCA-Leu-Ac y subunidades 50S o partículas : Efecto de concentración del sustrato. Las muestras en un volumen de 0,005 ml contenían antes de la adición de 33 % de metanol: Tris-ClH, pH 7,5, 50 mM (Ac)₂ Mg 20 mM, ClK 400 mM, esparsomicina 0,1 mM, CACCA(H³)Leu-Ac a la concentración indicada y 0,055 nM de subunidades 50S o partículas β . Se añadió 0,3 mg/ml de partículas inactivas γ para prevenir la adsorción de ribosomas por los tubos de vidrio donde se efectuó la incubación. Tiempo de incubación 2 horas. El ensayo fué efectuado por el método de adsorción en filtros de Millipore como se indica en métodos. La fijación inducida por esparsomicina fué estimada por substracción de los blancos incubados sin esparsomicina. En todos los casos la radioactividad de los blancos fué menos del 10 % de las muestras incubados en el sistema completo.



de densidad óptica y radioactividad de un sistema de incorporación de fenilalanina dirigida por el mensajero sintético poli U a diferentes tiempos de incubación. Por tanto al ser todos los ribosomas activos se puede asegurar que por cada ribosoma 50S existe en estas condiciones una molécula de CACCA-Leu-Ac y posiblemente una molécula de esparsomicina unida a él, existiendo pues un sólo sitio de fijación del sustrato donador al ribosoma. Este resultado está de acuerdo con el modelo postulado por Watson (1964) sobre la existencia de un sitio donador y otro aceptor en el ribosoma durante la biosíntesis de proteínas.

El efecto estimulante de la esparsomicina parece deberse pues no a la exposición de nuevos sitios de fijación del sustrato al ribosoma, sino a la estabilización de dicha fijación, lo que está de acuerdo con los experimentos descritos anteriormente en este capítulo y los obtenidos más tarde por Goldberg (1969), Monro, Jiménez y Vázquez (1970) con N-acetil-aminoacil-tRNA y Battaner (Tesis doctoral) en la fijación de CACCA-Leu-Ac a ribosomas 80S de levadura. De todos estos resultados podemos sugerir un mecanismo de acción de esparsomicina. Esparsomicina inhibe biosíntesis de proteínas en su etapa de elongación de la cadena peptídica por producir un bloqueamiento del sus-

trato donador en su extremo 3' en el centro enzimático peptidiltransferasa, haciéndole no reaccionable con el sustrato aceptor.

Aplicación del efecto de esparsomicina en los estudios de localización del centro peptidiltransferasa.

Como hemos visto una de las funciones primordiales del ribosoma, la formación de enlace peptídico, está localizada en la subunidad 50S. En un intento de caracterizar el centro catalítico de esta subunidad, relacionando estructura y función del mismo, se procedió a la eliminación progresiva de una serie de proteínas por centrifugación en gradiente de equilibrio de Cl Cs, ensayándose - en las partículas ribonucleoproteicas resultantes de actividad peptidiltransferasa mediante la reacción del fragmento y la fijación de CACCA-Leu(H³)-Ac. Estas partículas (T. Staehelin y col., 1969), contienen RNA 23S y 5S intacto, pero carecen de cantidades crecientes de las proteínas que forman parte de la subunidad 50S. Las partículas β carecen de todas las proteínas ácidas y al menos una de las básicas, carecido además las partículas γ de cinco-siete proteínas básicas.

En la Fig. 29 aparecen los resultados obtenidos en el ensayo de la actividad peptidiltransferasa de las subunidades 50S y las partículas α , β y γ obtenidas como se indica en métodos. La actividad aparece representada como función del tiempo de incubación. Como se puede observar tanto las partículas α como las β son activas, no así las γ que son inactivas. La actividad de α y β fué análoga a la de las subunidades 50S en ciertas preparaciones, disminuyendo su actividad con el tiempo.

En Tabla XXVI se ensayó la fijación de sustrato acetilado en presencia de esparsomicina. Como anteriormente - las partículas α y β son activas en esta fijación mientras las partículas γ son inactivas. Las proteínas separadas - en el paso de partículas 50S a β ($SP_{50} \rightarrow \beta$) como en el partículas β a γ ($SP \beta \rightarrow \gamma$) carecen tanto de actividad peptidiltransferasa como de capacidad de fijación de CACCA-Leu-Ac. Las partículas β casi completamente activas adquirirían la actividad de las partículas α al ser incubadas con la fracción proteica $SP_{50} \rightarrow \beta$ a 40°C en las condiciones indicadas al pie de la tabla. En cambio las partículas γ , completamente inactivas, no pudieron ser reconstituídas mediante la adición de las proteínas de las que carece. Aunque cuando se efectuaron estos ensayos no fué posible tal reconstitución, ésta ha sido posible posteriormente variando las -

FIG. 28.- Cinética de formación del complejo inducido por esparsomicina entre CACCA-Leu-Ac y subunidades 50S o partículas β a concentración saturante de sustrato. La mezcla de incubación contenía los mismos componentes que en Fig. 27, excepto que CACCA(H^2) Leu-Ac estaba a una concentración de $8,3 \times 10^{-7}M$; se empleó el mismo método de ensayo que en dicha figura.

FIG. 29.- Actividad peptidiltransferasa de subunidades 50S y partículas α , β y γ medida por reacción de CACCA-Leu-Ac con puromicina. Condiciones de ensayo como se indica en métodos para reacción de fragmento. Concentración de partículas ribosomales fué de 0,5 mg/ml.

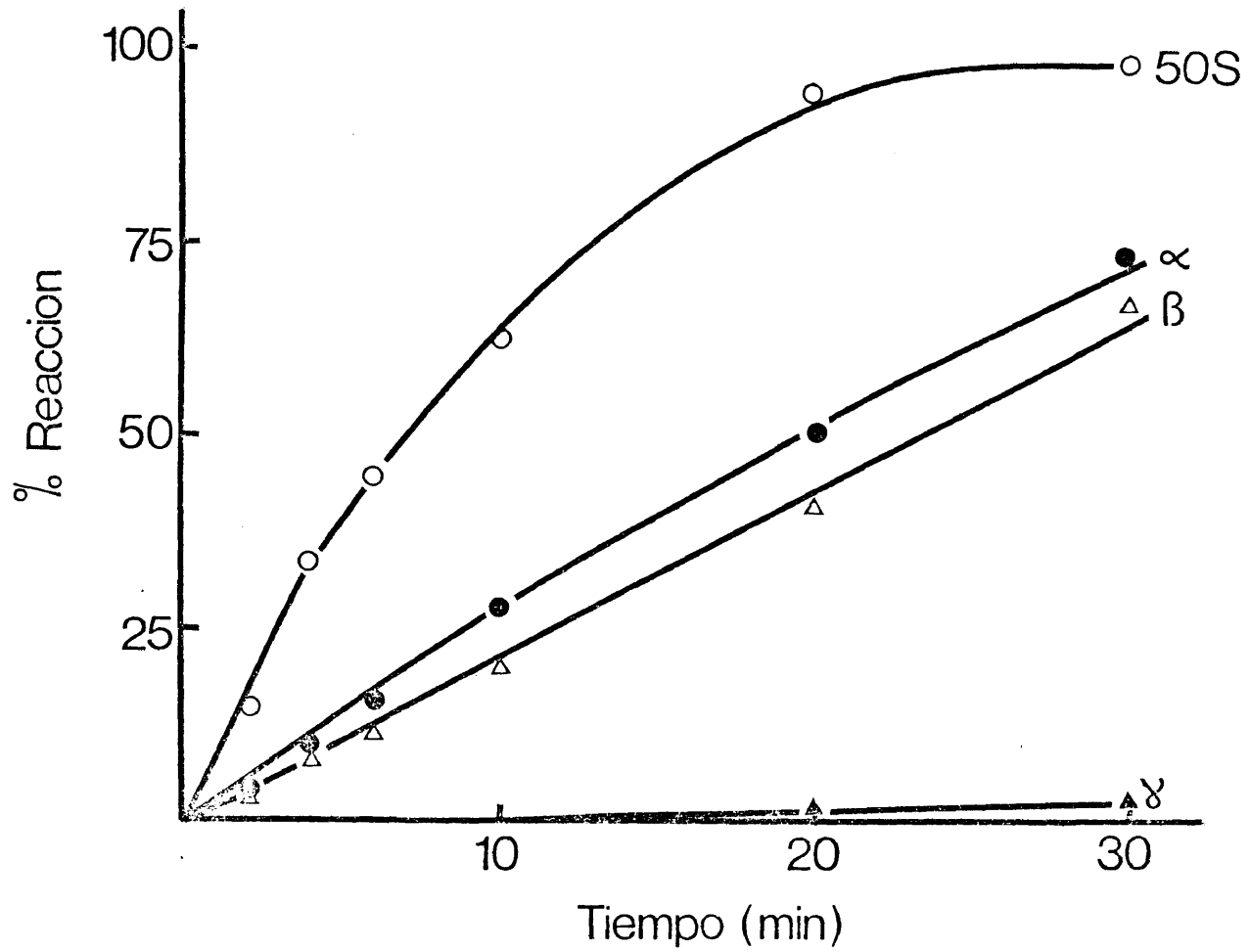
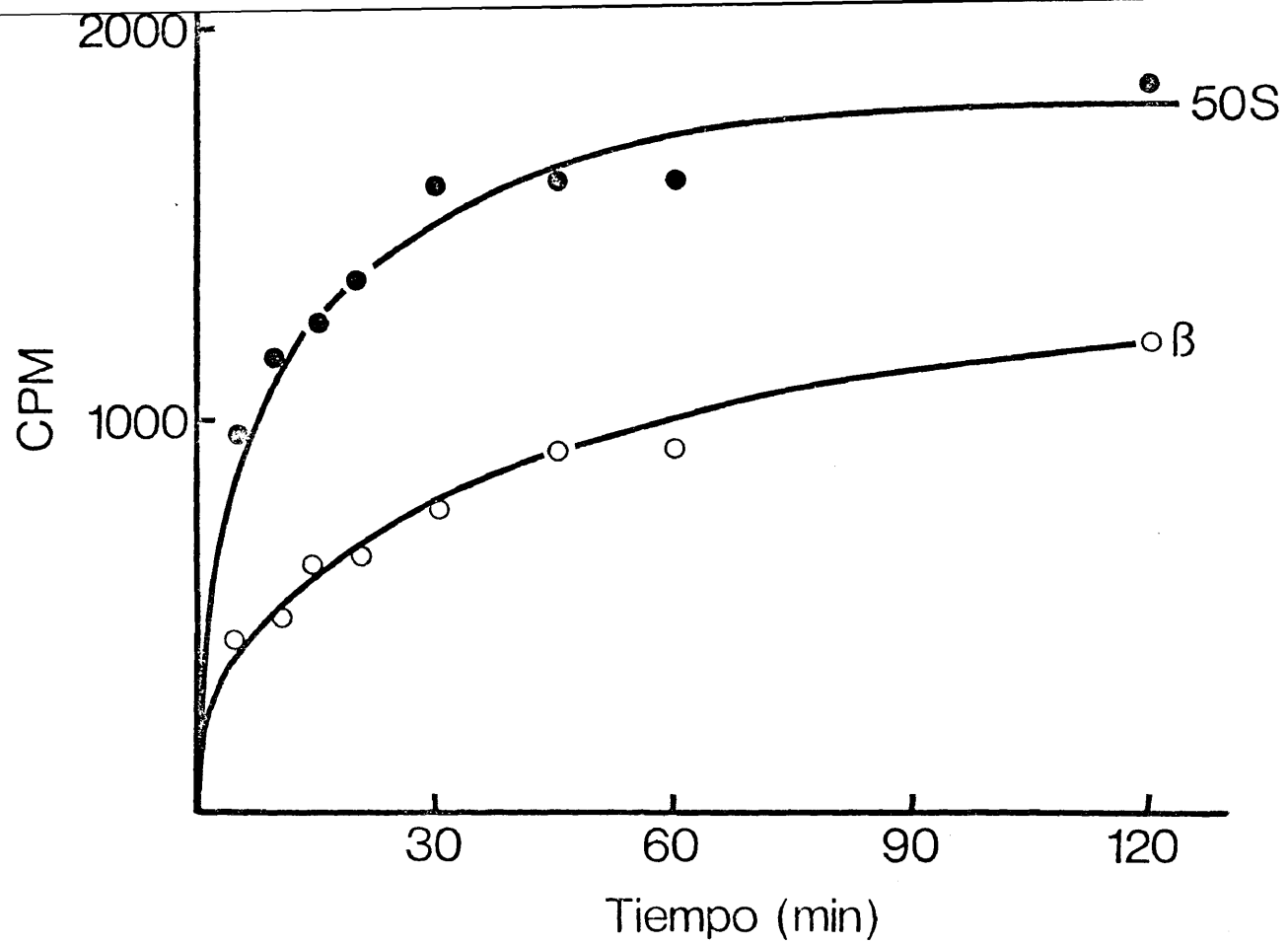




TABLA XXVI

FIJACION DE CACCA-Ac-Leu A FRACCIONES DE SUBUNIDADES 50S.

<u>Partícula</u>	<u>cpm</u> <u>(- blanco)</u>	<u>Fijación</u> <u>% del control</u>
1 α	1890	95
2 β	1680	84
3 ($\beta + SP_{50 \rightarrow \beta}$)	1840	92
4 ($\gamma + SP_{50 \rightarrow \beta}$)	140	7
5 ($\gamma + SP_{\beta \rightarrow \gamma}$)	170	8
6 ($\gamma + SP_{50 \rightarrow \beta} + SP_{\beta \rightarrow \gamma}$)	125	6
7 γ	40	2
8 $SP_{50 \rightarrow \beta}$	0	0
9 $SP_{\beta \rightarrow \gamma}$	0	0

La mezcla de incubación contenía en un volumen de 0,005 ml los siguientes componentes: esparsomicina 0,1 mM; 13 mM, (Ac)₂Mg 13 mM, acetato magnésico, ClK 270 mM, Tris-ClH, pH 7,5, 33 mM, 0,1 mM CACCA (H³)-Leu-Ac, actividad específica 10,3 Ci/mmol, 33 % de metanol y 0,1 mg/ml de partículas α ó β , 0,3 mg/ml de partículas γ ó proteínas $SP_{50 \rightarrow \beta}$, $SP_{\beta \rightarrow \gamma}$ en una concentración equivalente a 0,5 mg/ml de ribosomas, según se indica. Las muestras 1, 2, y 3 contenían 0,3 mg/ml de partículas γ para impedir la adsorción de partículas por el vidrio. El ensayo fué efectuado por el método de adsorción a filtros Millipore como se indica en métodos. Tiempo de incubación fué de 2 horas. Se tomó como 100 % la fijación de sustrato a subunidades 50S. En todos los casos se sustrajo la radioactividad debida a la fijación de CACCA-Leu-Ac a los filtros en ausencia de ribosomas.

Símbolos entre paréntesis como ($\beta + SP_{50 \rightarrow \beta}$) significan partículas reconstituídas a partir de ambos componentes por ca-

lentamiento a 40°C durante 10 min en las condiciones iónicas de ClHN_4 0,25 M, $(\text{Ac})_2\text{Mg}$ 0,015 M, Tris- ClH pH 7,5, 0,02 M, y β mercaptoetanol 0,003 M.

condiciones iónicas y de calentamiento del proceso (T. Staehelin y col., 1969).

Con objeto de averiguar si el número de sitios de fijación a las partículas β era el mismo que el encontrado con las subunidades 50S. Se efectuó un experimento de saturación en un tiempo en que se había establecido el equilibrio de fijación (Fig. 28). Como se puede observar en la Fig. 27, con esta preparación de partículas β se fijaban 0,6 mol de sustrato por cada mol de partícula. Este resultado podía indicar la existencia de una población heterogenea de partículas, provenientes de la pérdida de distintas proteínas, lo que podría traducirse por la posesión de distinta densidad. Para ver si esta heterogeneidad podía pues ser localizada, de modo que dentro de las partículas β , las situadas en la zona superior β_u tuviera distinta actividad que las situadas en la zona inferior, se recogieron con sumo cuidado y mediante una jeringa las partículas de dichas zonas para ser ensayadas en experimentos de fijación. Sin embargo esta diferencia, si existe, no pudo ser apreciada, ya que como se muestra en Tabla XXVII la fijación de sustrato a las partículas de ambas zonas fué igual.

TABLA XXVII

FIJACION DE CACCA-Leu-Ac A RIBOSOMAS

<u>Partícula</u>	<u>Fijación</u> <u>% del control</u>
β_u	70
β_l	71

La mezcla de incubación fué como en Tabla XXVI. Ensayo de fijación por adsorción a filtros Millipore como se indica en métodos.

El hecho de que la pérdida de la actividad peptidil transferasa vaya acompañado de la pérdida de fijación estimulada por esparsomicina soporta el modelo de que esparsomicina actúa directamente sobre el centro peptidiltransferasa de las subunidades 50S. De otro lado la observación de que las partículas β sean activas eliminan la posibilidad de que las proteínas acídicas y ciertas proteínas básicas sean posibles componentes del centro activo. El que existan partículas inactivas que puedan reconstituir su actividad mediante la adición de las proteínas de que carece, hace posible pensar que estas proteínas contengan los componen-

tes activos responsables de la acción peptidiltransferasa y de la fijación de sustratos y antibióticos y que sea necesaria la presencia de la partícula ribonucleoproteica para su actividad. Aunque también es posible que el centro esté intacto en las partículas (Y) pero que sean necesarias las proteínas eliminadas para que se encuentre en una forma activa.

CONCLUSIONES

El que los ensayos de formación de enlace peptídico con el sistema simplificado de reacción de fragmentos terminales de 3' de acetil-aminoacil-tRNA con puromicina sean catalizadas por ribosomas de E. Coli, B. subtilis y el alga azul Anacystis montana, muestra la generalidad de esta prueba para el estudio de aquella etapa de la biosíntesis de proteínas en otros microorganismos procarióticos distintos a E. Coli, en el que se ha caracterizado. El grado de correlación de la susceptibilidad a diversos antibióticos de los ribosomas de aquellos microorganismos para este ensayo con su actividad inhibidora in vivo contribuye a garantizar la significación de esta reacción.

Se desarrolló y caracterizó un sistema de fijación al centro enzimático peptidiltransferasa de CACCA-Leu-Ac y UACCA-Leu demostrándose son sustratos de la misma. Tal sistema ofrece la ventaja en el estudio del centro peptidiltransferasa de evitar las interacciones de los sustratos naturales aminoacil-tRNA y peptidil-tRNA con otras partes del ribosoma. Tanto CACCA-Leu-Ac como UACCA-Leu se fijan reversiblemente a la subunidad 50S, no quedando éstos mo-

dificados tras dicha fijación. El sustrato acetilado se fija como se ve en los ensayos con esparsomicina hasta la proporción de una molécula por ribosoma. Para el no acetilado parece haber una fijación de alta afinidad para un sitio de la subunidad 50S, mientras que a mayores concentraciones de las empleadas usualmente a lo largo de este estudio, vemos que se fija con mucha menor afinidad a otro sitio ribosomal. Los sitios de fijación preferente para ambos sustratos concluimos que son distintos por los siguientes resultados: I) Mientras que la fijación de CACCA-Leu-Ac es igual para ribosomas 70S que para sus subunidades 50S, la fijación del sustrato no acetilado a 50S es incrementada por la presencia de subunidades 30S. II) Es distinta la cinética de fijación para ambos. III) Precizando ambos sustratos para su fijación a 50S de Mg^{++} y K^+ , para la fijación a ribosomas 70S de CACCA-Leu-Ac hay mayor requerimiento de Mg^{++} , mientras que UACCA-Leu lo tiene mayor para K^+ . Por otra parte el conocimiento de la influencia de estos iones en el estado de agregación de los ribosomas, sugiere que UACCA-Leu interacciona con la subunidad 50S en la zona de unión de ésta con la 30S. IV) El comportamiento de algunos antibióticos es radicalmente distinto en la fijación de ambos sustratos.

A la vista de lo anteriormente expuesto y del resultado de que el sustrato acetilado reaccionada con mucha mayor velocidad que el no acetilado con puromicina, junto con la estimulación de su fijación por cloranfenicol, concluimos que CACCA-Leu-Ac se fija al sitio donador de peptidiltransferasa.

A su vez el que UACCA-Leu se fije a sitio distinto de CACCA-Leu-Ac, sea inhibido en su fijación por cloranfenicol, antibiótico que compite con fijación de puromicina, y el que se forme, aunque en pequeña cantidad, leucil-leucina por su fijación, nos lleva a afirmar que UACCA-Leu se fija al sitio aceptor de peptidiltransferasa aunque también parece fijarse con mucha menor afinidad al sitio donador.

Este estudio de fijación en primer lugar indica a partir de la esteoquimetría de la fijación de CACCA-Leu-Ac que existe un sólo centro enzimático de formación de enlace peptídico por ribosoma. Da luz sobre el desconocido efecto estimulador de etanol sobre la formación de enlace peptídico en subunidades 50S, indicando se ejerce al menos a nivel de fijación de sustratos, aumentando su afinidad por el ribosoma. Indica la existencia de dos sitios distintos para la fijación de sustratos de peptidiltransferasa con

especificidad determinada sólomente por el bloqueo o no del NH_2 en α del aminoácido unido al tRNA.

La existencia de estos dos sitios con esta especificidad está en contra de los modelos como los de Sweet (1965) y Woese (1970), que postulan la presencia en el ribosoma de dos sitios simétricos distinguibles sólomente en su capacidad aceptora o donadora por la configuración del área distal de tRNA que contiene el triplete reconocedor del tRNA.

De los resultados de interacción de cloranfenicol con los fragmentos de tRNA empleados, se deduce que este antibiótico al inhibir fijación de sustrato no acetilado, debe de bloquear la formación de enlace peptídico por inhibir fijación del extremo terminal 3' del aminoacil-tRNA. Desde este sitio, dado que estimula fijación del sustrato acetilado, incrementa la fijación de peptidil-tRNA, pudiendo este efecto tener significación en su acción inhibidora.

Lincomicina, ya que inhibe fijación de ambos sustratos, preferencialmente el no acetilado, posiblemente bloquea formación de enlace peptídico por impedir la fijación de los extremos 3' de aminoacil y peptidil-tRNA. Su análogo estructural celesticetina, puesto que estimula fijación de ambos sustratos, debe inhibir la peptidiltransferasa por un mecanismo no competitivo. Es de destacar que se tra-

ta del único antibiótico de todos los ensayados que inhibe reacción de formación de enlace peptídico no impidiendo fijación de ninguno de los dos sustratos.

Del grupo de los macrólidos que inhiben formación de enlace peptídico, carbomicina y espiramicina III, ejercen su efecto a nivel de la fijación de ambos sustratos, - impidiendo su interacción con el ribosoma. Eritromicina y oleandomicina que por el contrario, no bloquean formación de este enlace, estimulan la fijación del sustrato acetilado, mientras que oleandomicina sólo inhibe parcialmente fijación del no acetilado. Estas diferencias sitúan la fijación de los distintos macrólidos dentro del área de la peptidiltransferasa, permitiendo al mismo tiempo conocer qué partes de la molécula son responsables de sus interacciones con aquella.

Se encuentra por otra parte que la reversión por eritromicina de la inhibición producida por cloranfenicol o lincomicina en síntesis de proteínas se localiza en el centro peptidiltransferasa de los ribosomas.

Del Grupo de las estreptograminas, estreptogramina A inhibe fijación de los sustratos acetilado y sin acetilar, mientras que viridogriseina, el más activo inhibidor de biosíntesis de proteínas del grupo de las estreptograminas B,

que no bloquea la reacción de fragmento, estimula considerablemente la fijación de ambos sustratos. Este hecho indica que aunque exista solapamiento entre sus sitios de interacción con el ribosoma, su mecanismo de acción es distinto.

Los antibióticos tetraciclina, sulfato de polidextranso y edeina inhibidores de fijación de aminoacil-tRNA al ribosoma, no ejercen ningún efecto sobre la fijación de los dos sustratos simplificados, lo que sitúa su interacción con el ribosoma en lugares distintos a este centro enzimático. De la misma manera siomicina que inhibe fijación de factor G de traslocación y de aminoacil-tRNA a 50S, hemos visto no afecta fijación de su extremo terminal 3', lo que contribuye a la localización de fijación de G con respecto a peptidiltransferasa.

Mayor información se ha obtenido sobre el modo de actuar esparsomicina en su inhibición de síntesis de proteínas. Así, hemos encontrado que: a) Esparsomicina produce una estimulación en la fijación del sustrato acetilado no dependiente de la presencia de subunidades 30S; b) el complejo (ribosoma-sustrato acetilado-esparsomicina) tiene una gran estabilidad, lo que hace al sustrato acetilado no reactivo con el sustrato aceptor puromicina. Esta fijación no

procede por enlaces covalentes con el sustrato, siendo la esteoquimetría de mol a mol para 50S y sustrato; c) la capacidad de formar este complejo se mantiene paralela a la de formación de enlace peptídico en ribosomas deficientes en proteínas específicas separadas por alta concentración de iones. Esto corrobora que la actuación de esparsomicina es específica para el área de peptidiltransferasa; d) la formación del complejo es inhibida por cloranfenicol, amicetina, gougerotina, carbomicina, espiramicina III, estreptogramina A y lincomicina. Los antibióticos que no inhiben fijación del sustrato acetilado, cloranfenicol, amicetina y gougerotina, deben de interaccionar pues con el sitio de fijación de esparsomicina al ribosoma, lo cual posiblemente contribuye a que los tres estimulen, aunque en menor grado que esparsomicina, la fijación de sustrato acetilado.

A la vista de los datos presentados, se postula un mecanismo de acción sobre biosíntesis de proteínas del antibiótico esparsomicina.

B I B L I O G R A F I A

- Adams, J.M. - J. Mol. Biol. 33, 571, (1968)
- Adams, J.M. y Capecchi, M.R. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 1966.
- Allen, D.W. y Zamecnick, P.S. Biochim. Biophys. Acta, 47, 865, (1962).
- Allende, C.U., Chaimovide, H., Gatia, M. y Allende, J.- J.Bio-log. Chem. 245, 93, (1970).
- Barber, M. y Waterworth, P.M. Brit. Med. J., 2, 603, (1964).
- Battaner, E. Tesis doctoral Medicina, Salamanca, (1971).
- Beard, N.S. Steven J.R., Armentrout, A, y Weisberger, A.S. Pharmacology Rev. 21, 213 (1969). h
- Bhuyan, B.K. Biochem. Pharmacol. 16, 1411, (1967).
- Bhuyan, B.K. en "Antibiotics Vol. I: Mechanism of Action". Ed. por Gottlieb y P. Shaw; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, N.Y., 1967, pág. 169.
- Bloch, A. y Goutsogeorgopoulos, C.- Bioch. 5, 3345, (1966).
- Bojley, J.W. y Lillian, L. Nature, 227, 60, (1970).
- Bonotto, S., Goffean, A., Sanowski, M., T. van der Driesshe y T. Brachet, Biochem. Biophys. Acta, 174, 704 (1969).
- Borst, P. y Grivelli, L.A. Febs Letters, 13, 73 (1971).
- Borst, P. Kroon, A.M. y Ruttenber, C.J.C., en "Genetic elements, properties and function", Ed. D. Shugár; Academic Press, London y Warsaw, 1967, pág. 81.
- Bretscher, M.S. Nature, 218, 675, (1968).
- Bretscher, M.S. y Marcker, K.A. Nature, 211, 380, (1966).

- Brocks, T.D. I. Bacteriol. 85, 527, (1963).
- Brocl, T.D., Brock, M.L. Biochim. Biophys. Acta, 33, 274, (1959).
- Cannon, M., Krug, R. y Gilbert, W., J. Mol. Biol., 7, 360, (1963).
- Cammack, K.A., Wade, H.E., Biochem. J., 96, 671 (1965).
- Campbell, P.N. y Sargent, en "Techniques in protein synthesis, Vol. 2, Ed. Academic Press, London, New York, 1969.
- Cappechi, M.R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 1517, (1966).
- Cappechi, M.R. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 58, 1144, (1967).
- Cappechi, M.R., y Klein, H.A., Nature, 226, 1029, (1970).
- Casjens, S.R. y A. J. Morris, Bioch. Biophys. Acta, 108, 677, (1965).
- Caskey, T., Scolnik, E., Tompkins, R., Coldstein, J. y Milman, G., Cold Spring Harboz Symp. Quant. Biol., 34, 479, (1969).
- Cassio, D. y Waller, J.P. Europ. J. Biochem., 5, 33, (1968).
- Cerná, J., I. Rychlik, P. Pulkkrabeck, Eur. J. Biochem. 9, 27, (1969).
- Chang, F.N., Siddhikal, C. y Weissblum, B.- Biochem. Biophys. Acta, 186, 396, (1969).
- Chang, F.N., Sih, C. y Weissblum, B.- Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 431, (1966).
- Chang, F.N. y Weissblum, B., Biochem. 6, 836, (1961).
- Chang, F.N. y Weissblum, B. en "Antibiotics Vol. I: Mechanism of action", Ed. por D. Gottlieb y P. Shaw; Springer Verlag; Berlin-Heildelberg, N.Y., 1967, pag.440.
- Chapeville, F. y Haenns, A.L.- Bull. Soc. Chim, Biol., 51, 1459, (1969).
- Clark, B.F.C. y Marcker, K.A., J. Mol. Biol. 17, 394, (1966).

- Clark, J.M. en "Antibiotics Vol. I: Mechanism of action", Ed.
por D. Gottlieb y P. Shaw, Springer-Verlag;
Berlin-Heidelberg, N.Y., 1967, pag. 278.
- Clark, J.M. y Chang, A.Y. J. Biol. Chem. 240, 4734 (1965).
- Clark, J.M., y Gunther, J.K. Biochem. Biophys. Acta, 76,
636, (1963).
- Cohen, L.B., Goldberg, I.H. y Herner, A.E. Biochem. 8, 1327,
(1969).
- Colombo, B., Felicetti, L. y Baglioni C. Biochem. Biophys.
Acta, 119, 109, (1966).
- Connamacher, R.M. y Mandel, H.G., Biochem., Biophys. Acta,
166, 475, (1968).
- Coutsgeorgopoulos, C. Biochem. Biophy. Res. Commun, 27, 46
(1967).
- Culp. W.J., Mc. Keehan W.L. y Hardesty, B. Proc. Natl. Acad.
Sci, U.S. 63, 1431, (1969).
- Day, L.E., J. Bacteriol. 92, 197 (1966).
- Demoss, J.A., Novelli, G.D. Biochem. Biophys. Acta, 22, 49,
(1956).
- Dube, S.K., Marcker, K.A., Yudelevich, A., Febs Letters, 9,
168 (1970).
- Dube, S.K., Rudland, P.S., Nature, 226, 824, (1970).
- Dube, S.K., Rudland, P.S., Clark B.F.C., Marcker, K.A.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 161,
(1969).
- Ennis, H.L. Mol. Pharmac. 2, 444, (1966).
- Ennis, H.L. Biochem. 10, 1265, (1971).
- Erbe, R.W. y Leder, P., Bioch. Biophys. Res. Commun, 31,
789 (1968).
- Falmestock, S., Neumann, H., Shashova, V. y Rich, A. Biochem.
9, 2477, (1970).

- Felicetti, L. Colombo, B. y Baglioni, C. Bioche. Biophys. Acta, 119, 120, (1966).
- Fellig, J. y Wiley, C.E. Arch. Biochem. Biophys. 85, 313, (1959).
- Fernández Múñez, R. Tesis doctoral, Madrid, 1971.
- Firkin, F.C. y Linane, A.W. Febs Letters, 2, 330, (1969).
- Franklin, J.J. Biochem. J., 87, 449 (1963).
- Gale, E.F. y Folkes, J.P., Biochem. J. 63, 493, (1953).
- García Ballesta, J.B. Comunicación personal.
- Gesteland, R.F., J. Mol. Biol. 18, 356, (1966).
- Ghyssen, A., Bollen, A., Herzog, A. Eur. J. Biochem. 13, 132, (1970).
- Gilbert, W. J. Mol. Biol. 6, 389 (1963).
- Goldberg, I.H., J. Mol. Biol. 15, 663, (1966).
- Goldberg, I.H. y colab., Biochem. 8, 1335, (1969).
- Goldberg, I.H. y Mitsugi, K. Biochem. Biophys. Res. Commun, 23, 453, (1966).
- Goldberg, I.H. y Mitsugi, K. Biochem. 6, 372, (1967 a).
- Goldberg, I.H. y Mitsugi, K. Biochem. 6, 383, (1967b).
- Goldstein, J., Bennett, T.P., y Graig, L.C. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.
- Gottesman, M.A., J. Biol. Chem. 242, 5564 (1967).
- Gutherie, C. y Nomura, M., Nature, 219, 232 (1968).
- Haenni, A.L., Chapeville, F. Biochem. Biophys. Acta, 114, 135, (1966).
- Haenni, A.L., Lucas-Lenard, J. Proced. Natl. Acad. Sci., U.S. 61, 1363 (1968).

- Harvey, C.L., Knight, S.G. y Shi, C.L. Biochem., 5, 3320, (1966).
- Hayashi, H., Knowles, J.R., Katze, J.R., Lapointe, J. y Söll, D. J. Biol. Chem., 245, 1401, (1970).
- Herner, H.E., Golberg, I.H. y Cohen, L.B., Biochem. 8, 1335, (1969).
- Hershey, J.W.B. Dewey, K.F. y Thach, R.E. Nature, 222, 944, (1969).
- Hershey, J.W.B. y Monro, R.E. J. Mol. Biol. 18, 68, (1966).
- Hershey, J.W.B. y Thach, R.E. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. 57, 759, (1967).
- Herzberg, M. Lelong, J.C. y Revel, M. J. Mol. Biol. 44, 297, (1967).
- Hierowski, M. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 53, 594 (1965).
- Hierowski, M., Kurylo-Borowska, Z. Bioch. Biophys. Acta, 95, 578, (1965).
- Hill, W.E., J. Mol. Biol. 53, 107, (1970).
- Hille, M.B., Miller, M.J., Iwasaki, K. Wahba, A.J., Proc. Natl. Acad. Sci, U.S. 58, 1652, (1967).
- Hoagland, M.B., Biochem. Biophys. Acta, 16, 288 (1955).
- Huxley, H.E. y Zubay, G. J. Mol. Biol. 2, 10 (1960).
- Igarashi, K., J. Biochem. 67, 133 (1970).
- Igarashi, K. Ishitsuka, H. y Kaji, A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 499 (1969).
- Igarashi K. y Kaji, A. Eur. J. Biochem., 14, 41 (1970).
- Ingram, V.M. y Stretton O.W. Biochem. Biophys. Acta, 62, 456, (1962).
- Jayaraman, J. y Goldberg, I. Biochem. 1, 418 (1968).
- Jonak, J. y Rychlik, I. Biochem. Biophys. Acta, 199, 421, (1970)

- Josten, J.J. y Allen, P.M. Biochem. Biophys. Res. Commun, 14, 241, (1964).
- Kaji, A. Igarashi, K. y Ishitsuka H. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 167 (1969).
- Katze, J.R. y Konigsberg, W., J. Biol. Chem. 245, 923 (1970).
- Kinoshita, T. Kawano G. y Tanaka N. Biochem. Biophys. Res. Commun, 33, 769, (1968).
- Klem E.B., Hsu W.I., Weiss S.B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67, 697, (1970).
- Kohler, R.W., Ron E.Z., Davis B.D., J. Mol. Biol. 36, 7, (1968).
- Kurylo Borowska, Z. Biochem. Biophys. Acta, 61, 897, (1962).
- Korylo Borowska, Z. y Hierowski, M. Biochem. Biophys. Acta, 25, 590, (1965).
- Lagerkvist, U., Rymo, L. yWaldenström, J. J. Biol. Chem. 241, 5391, (1966).
- Laskin, A.I. en "Antibiotics Vol. I: Mechanism of action", Ed. por D. Gottlieb y Pishaw, Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, N.Y., 1967, pág. 331.
- Laskin, A.I. Chan W.M. Biochem. Biophys. Res. Commun, 14, 137, (1964).
- Last, J.A., Izaki, K. Shell, J.F. Biochem. Biophys. Acta, 174 400, (1969).
- Leder. P. , Skogerson, L.E., Roufo, D. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S. 62, 928 (1969).
- Lengyel, P. y Söll, D. Bacteriol. Rev. 33, 264, (1969).
- Lipmann, F., Science, 164, 1024 (1969).
- Lodish, H.F., Nature, 220, 345, (1968).
- Lodish, H.F. J. Mol. Biol. 50, 689, (1970).
- Lucas-Lenard, J. y Haenni, A.L., Proc. Natl. Acad. Sci, U.S. 59, 554, (1968).

- Lucas-Leonard, J. y Lipmann, F. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 57, 1050, (1967).
- Macdonald, J.S. y Goldberg, I.H., Biochem. Biophys. Res. Commun, 41, 1 (1970).
- Maden B.E.H., Monro R.E., Eur. J. Biochem. 6, 309, (1968).
- Maden B.E.H., Traut, R.R., Monro, R.E. J. Mol. Biol. 35, 333 (1968).
- Mangiarotti, G. , Schlessinger, D., J. Mol. Biol. 20, 123, (1966).
- Mao J.C.H. y Putterman, J. J. Mol. Biol. 44, 347, (1969).
- Mao J.C.H. y Robishaw, R.C. Biochem. en prensa.
- Mao, J.C.H. y Wiegand, R.C. Biochem. Biophys. Acta, 157, 404. (1968).
- Marckor, K., J. Mol. Biol. 14, 63 (1965).
- Marcker, K. y Sanger, F. J. Mol. Biol. 8, 835, (1964).
- Mathews M.B. y Korner, A. Europ. J. Biochem. 17, 328 (1970).
- Miller, G. y Weissbach, H. Biochem. Biophys. Res. Commun, 38, 1016 (1970).
- Miskin, R., Zamir, A., Elson D. Biochem. Biophys. Res. Commun, 33, 551, (1968).
- Miyazawa, F. Olijnyk O.R., Tilley, C.I. y Tamaoki, T. Biochem. Biophys. Acta, 145, 96 (1967).
- Modolcell, J. Cabrer, B., Parmegiani, A. Monro R.E. y Vázquez, D. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S. en prensa.
- Monro, R.E., Nature, 223, 903 (1970).
- Monro, R.E. Cerná, J., Marcker, K.A., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S. 61, 1042 (1968).
- Monro, R.E., Marcker, K.A., J. Mol. Biol. 25, 347 (1967).
- Monro, R.E., Staehelin, T. Celma, M.L. y Vázquez, D. Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol. 34, 357, (1969).

- Monro, R.L., Vázquez, D., J. Mol. Biol. 28, 161 (1967).
- Morris, A., Schweet, R. Biochem. Biophys. Acta, 47, 415, (1961).
- Munro, A.J. Abstr. Commun. Meet. Fed. Eur. Biochem. Sec. 2 (1965).
- Nathans, D. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 585, (1964).
- Nathans, D. y Lipmann, F. Proc. Natl. Acad. Sci, 47, 497, (1961).
- Neth, R. Monro, R.L., Heller, G. Battaner, E. y Vázquez, D. FEBS Letters, 6, 198 (1970).
- Nichols, J.L. Nature, 225, 147 (1970).
- Nirenberg, M.V., Mattaci, J.M. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 47, 1588, (1961).
- Nishizuka Y., Lipmann, F. Proc. Nat. Acad. Sci, 55, 212 (1966).
- Nobuyoshi, S., Hayashi, H., Miura, K. J. Biochem. 67, 373, (1970).
- Noll, H. Science, 151, 1241 (1966).
- Nomura, M., Bacteriol. Rev. 34, 228 (1970).
- Nomura, M., Lowry, C.V. y Guthrie, G. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58, 1487, (1967).
- Norris, A.T., Berg P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 52, 330, (1964).
- Ohta, T. , Sarkar, S., Thach, R.L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 58, 1638, (1967).
- Okazaki, T., Kornberg, A., J. Biol. Chem. 239, 259, (1964).
- Oleinick, N.L. y Corcoran, J.W., J. Biol. Chem. 244, 727, (1969).
- Oleinick, N.L., Corcoran, J.W., en "Progress in Antimicrobiol and Anticancer Chemotherapy", Vol. I. University of Tokyo Press. Tokyo, 1970, pág. 202.

- Ono, Y., Skoultchi, A., Kleins, A. y Lengyel, P. Nature, 220
1304, (1968).
- Ono, Y., Skouttchi, A., Waterson J. y Lengyel, P., Nature, 223
697, (1969).
- Ostrem D.L., y Berg, P. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67, 1967,
(1970).
- Owen S.P., Dietz A. y Camiener, G.W. Antimicrobiol. Agents
Chemoth, 772, 1962.
- Panet, A., Groot, N. y Lapidot, Y., Eur. J. Bioch. 15, 223,
(1970).
- Pestka, S. Arch. Biophys. Biochem. 136, 80 (1970).
- Pestka, S. y Nirenberg, M. J. Mol. Biol. 21, 145, (1966).
- Phillips, A., Hotham Iglewski B. y Franklin R.M. J. Mol. Biol.
45, 23, (1969).
- Preddie, E.C., J. Biol. Chem. 244, 3958 (1969).
- Ravel, J.M., Shorey, R.A.L. y Shive, W. Biochem. 9, 5028, (1970).
- Revel, M. Brawerman, G., Lelong, J.C. y Gras, F. Nature, 219,
1016 (1968).
- Revel, M., Greenshpan G., Herzberg, H., Groner, Y y Pollack,
en 8th International Congress of Biochem., Sui-
za, 1970.
- Rodriguez-López, M., Celma, M.L., Fernández Muñoz, R. y Váz-
quez, D. en Atti VII Simposio Internazionale di
Agrochimica "La sintesi biologica delle protei-
re", 1968, pág. 63.
- Rodriguez-Lopez, M. Vázquez, D. , Life Sciences, 7, 327, (1968).
- Rouget, P. y Chapeville, F., Eur. J. Biochem., 4, 310, (1968).
- Rychlik I. Biochem. Biophys. Acta, 114, 425 (1966).
- Rychlik I., Chládek, S. y Zemlicka, J., Biochem. Biophys. Ac-
ta, 138, 640, (1967).

- Sabol, S., Sillero M.A.G., Iwasaki K. y Ochoa, S. Nature, 228, 1269 (1970).
- Sala, F. y Ciferri, O. Biochem. Biophys. Acta, 224, 199, (1970).
- Salser, W., Gesteland, R.F. Bolle, A. Nature, 215, 588, (1967).
- Scatchard, G. Ann. New York Acad. Sci, 51, 660, (1949).
- Scolnick, E., Milman, G., Roisman, M., Caskey, T. Nature, 152, 225, (1970).
- Scolni, K.E., Tomkins, R., Caskey T. y Nirenberg, M. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S. 61, 768, (1968).
- Shinozawa, T., Yahara, I., Imahori, K. J. Mol. Biol. 36, 305, (1968).
- Shorey, R.L., Ravel, J.M., Garner, C.W., Shive, W., J. Biol. Chem. 244, 4555, (1969).
- Silverstein, E., Biochem. Biophys. Acta, 186, 402 (1969).
- Silverstein, E.; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 366, (1969).
- Sinohara, H. Shy, Perk H.H., Biochem. Biophys. Res. Commun, 18, 98 (1965).
- Skoutchi, A.S., Ono, Y., Mann, H.M., Lengyel P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 60, 675, (1968).
- Skouttchi, A.S., Ono, Y., Waterson, J., Lengyel, P., Biochem. 9, 509, (1970).
- Slecht, L. Antimicrob. Agents and Chemotherapy 326 (1965).
- Smith, J.D. en "Methods in Enzimology" Ed. L. Grossman y K. Moldove Vol. II, Parte A. pag. 350.
- Spirin, A.S., Gavrilova, L.P. en "The ribosome" Ed. Kleinze-ller, Springer y Wittman, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, N.Y. 1969.

- Staehelin, T., Maglott, D. Monro, R.L., Cold Spring Harbor
Sym. Quant. Biol. 34, 39, (1969).
- Stanley, W.M. Salas, M. Wahba, A.J. y Ochoa, S. Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S. 56, 290, (1966).
- Steitz, J.A., Nature, 224, 957, (1969).
- Suarez, G. Nohans, D., Bioch. Biophys. Res. Commun, 18,
743, (1965).
- Subramanian, A.R., Davis, D.D., Nature, 228, 1273, (1970).
- Suhadolnick, R.J. en "Nucleoside antibiotics", Ed. Willey Inter
cience; New York, London, Sidney, Toronto,
1970, pág. 203.
- Swan, D., Sander, G., Bermek, E., Krämer, W.,-Kreuzer, T.,
Arglebe, C., Zöllner, R., Eckert K y Matthaci, H.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 179,
(1969).
- Szer, W., Brenowitz, J. Biochem. Biophys. Res. Commun, 38,
1154, (1970).
- Takanami, M., Biochem. Biophys. Acta, 55, 132, (1962).
- Takanami, M. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 52, 1271, (1964).
- Takeda, M. y Lipmann, F., Proc. Natl. Acad. Sci., 56, 1875,
(1966).
- Tanaka, K. Teraoka, H. Biochem. Biophys. Acta, 114, 204,
(1966).
- Tanaka, K. Teraoka, H. Nagira, T., Tamaki, M. Biochem. Biophys.
Acta, 123, 435, (1966).
- Tanaka, N., Kinoshita, T., Kuvano, Biochem. Biophy. Res. Com-
mun, 33, 769, (1968).
- Tanaka, N., Kinoshita, T., Masukawa, H., J. Biochem. 65, 459
(1969).
- Tanaka, N., Yamaki, H., Lin, Y. y Umezawa, H. J. Antibiotics.
20, 156, (1967).

- Taubman, S.B., Jones, N.R., Yong, F.E., Corcoran, J.W. *Biochem. Biophys. Acta*, 123, 438, (1966).
- Taylor, M.M., Storck, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 52, 1875 (1964).
- Teraoka, H., Tanaka, K., *Biochem. Biophys. Acta*, 232, 509, (1971).
- Teraoka, H., Tanaka, K., Tamaki, M. *Biochem. Biophys. Acta*, 174, 776, (1969).
- Thach, S.O., Thach, R.E. *Nature*, 229, 219, (1971).
- Tissieres, A., Watson, J.D., Schelessinger, D. y Hollingworth B.R., *J. Mol. Biol.* 1, 221, 1959.
- Tompkins, R.K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 66, 1164, (1970).
- Tompkins, R.K., Scolnik, E., Caskey, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 65, 702, (1970).
- Traut, R.R., Monro, R.E. *J. Mol. Biol.* 10, 63 (1964).
- Traut, R.R., Nomura, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 59, 777, (1968).
- Vázquez, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 409, (1963).
- Vázquez, D. *Nature*, 203, 257, (1964).
- Vázquez, D. *Biochem. Biophys. Acta*, 114, 289, (1966).
- Vázquez, D. *J. Gen. Microbiol.* 42, 93, (1966 a).
- Vázquez, D. *Biochem. Biophys. Acta*, 114, 277, (1966b).
- Vázquez, D. *Life Sciences*, 6, 381 (1967a).
- Vázquez, D. *Life Sciences*, 6, 845, (1967b).
- Vázquez, D. y Monro, R.E., *Biochem. Biophys. Acta*, 142, 155, (1967).
- Vogel, Z., Tamir, A. y Elson, D., *Biochem.* 8, 5161 (1969)
- Waller, J.P., *J. Mol. Biol.* 7, 483, (1963).

- Wilhelm, J.M. Corcoran, J.W. Biochem. 6, 2578, (1967).
- Wilhelm, J.M., Oleinick, N.L., Corcoran, J.W., Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy 236 (1967).
- Wisseman, C.L., Smodell, J.E., Hahn, F.F., Hopps, H.E., J. Bacteriol. 67, 662 (1964).
- Woese, C., Nature, 226, 817, (1970).
- Wollfe, A.D., Han F.H., Biochem. Biophys. Acta, 95, 146, (1965).
- Yamaki, H., J. Antibiotics, 18, 228 (1965).
- Yarmalinsky, M. y de la Haba, G. Proc. Natl. Acad. Sci, U.S. 45, 1721, (1959).
- Yarus, M., Berg, P. J. Mol. Biol. 28, 479, (1967).
- Yukioka, M. Morisawa, S., I. Biochem. 66, 241, (1969).
- Zamir, A., Leder, P. y Elson, D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 56, 1794, (1966).

Bray, G.A. Anal. Biochem. 1, 279 (1960).

Cory, S., Marcker, K.A., Dube, S.K., Clarck, B.F.C., Nature 220, 1039 (1968).

Dube, S.K., Marcker, K.A., Clark, B.F., Cory, S. Nature 218, 232 (1968)

Jiménez, A., Monro, R.E., Vázquez, D., FEBS letters 7, 103 (1970).

Smith, I. en "Chromatographic and electrophoretic techniques" Vol. I, William Heinemann. London, 1960.

Schweet, R., Arlinghaus, R., Heintz, R. y Schaeffer, J., M.D. Anderson Symposium (1965).

Watson, J.D., Bull. Soc. Chem. Biol. 46, 1399 (1964).